

EVALUACIÓN DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DENGUE-2
EN CEPAS DE *Aedes aegypti* QUE DIFIEREN EN SU SUSCEPTIBILIDAD
HACIA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS

MARÍA TERESA ORTIZ ORTIZ

CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES
MÉDICAS (CIDEIM)
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2017

EVALUACIÓN DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIRUS DENGUE-2
EN CEPAS DE *Aedes aegypti* QUE DIFIEREN EN SU SUSCEPTIBILIDAD
HACIA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS

María Teresa Ortiz Ortiz

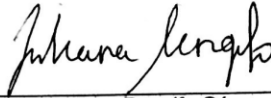
Proyecto de grado para optar al título de pregrado en biología

Tutor:

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD.
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Icesi

CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES
MÉDICAS (CIDEIM)
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI
2017

APROBADO POR:



Juliana Rengifo Gómez
EVALUADOR



Paola Andrea Caicedo Burbano
DIRECTORA DEL PROYECTO

SANTIAGO DE CALI, VIERNES, DICIEMBRE 1 DE 2017

AGRADECIMIENTOS

Durante este tiempo de aprendizaje en la Universidad Icesi, son muchas las personas a las que les debo agradecer por todo su apoyo y compañía. Especialmente a mi familia, por todo su amor y darme siempre lo mejor que tienen; principalmente a mi mamá y mi abuela, por brindarme la oportunidad de estudiar esta maravillosa carrera. A mis amigos, por todo su apoyo anímico en los momentos más difíciles. Al laboratorio de Control de Vectores del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), por brindarme el espacio y la oportunidad de llevar a cabo mi proyecto de grado. Finalmente, agradezco a la profesora Paola Caicedo PhD., Juliana Cabrera y Martha Ahumada por toda su dedicación, paciencia y colaboración durante estos meses de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	13
2.1 Planteamiento del problema de investigación y justificación	13
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
2.2.1 La enfermedad del dengue:	15
2.2.2 El virus dengue:.....	15
2.2.3 El vector:	18
2.2.4 Historia y epidemiología del dengue:	19
2.2.5 Control vectorial	20
2.2.6 Interacción virus-vector:	21
2.2.7 Transmisión vertical del virus dengue:	23
2.3 OBJETIVOS.....	25
2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA	26
2.4.1 Mantenimiento de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> :.....	26
2.4.2 Estandarización de la extracción de RNA en estadios inmaduros (huevos) de <i>Ae. aegypti</i>	29
2.4.3 Identificación del DENV-2 en las cepas CALI-S y CALI-MIB de <i>Ae. aegypti</i>	30
2.4.4 Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2	39
2.4.5 Secuenciación	40
2.4.6 Diseño experimental.....	43
2.5 RESULTADOS.....	44
2.5.1 Estandarización de extracción de RNA en huevos de <i>Ae. aegypti</i> 44	
2.5.2 Titulación del virus dengue-2	44
2.5.3 Identificación de DENV-2 en intestinos de las cepas Cali-S y Cali-MIB de <i>Ae. aegypti</i>	46
2.5.4 Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2	49
2.5.5 Secuenciación	51

2.6	DISCUSIÓN.....	52
2.7	CONCLUSIONES.....	57
2.8	RECOMENDACIONES.....	58
3.	BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus dengue	16
Figura 2. Diagrama del ciclo intracelular del DENV..	17
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 4. Barreras anatómicas en <i>Aedes aegypti</i> a la transmisión del DENV.	22
Figura 5. Mantenimiento de estadios inmaduros de <i>Ae. aegypti</i>	26
Figura 6. Mantenimiento de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	27
Figura 7. Equipo de alimentación artificial con alimentadores de vidrio..	28
Figura 8. Mantenimiento de los mosquitos <i>Ae. aegypti</i> para la colección de huevos.	28
Figura 9. Cultivo celular C6/36.....	31
Figura 10. Alimentación artificial de las cepas Cali-S y Cali-MIB de <i>Ae.</i> <i>aegypti</i>	32
Figura 11. Individualización de mosquitos hembras de las cepas Cali-S y Cali- MIB de <i>Ae. aegypti</i>	33
Figura 12. Titulación del DENV-2.....	35
Figura 13. Disección de intestino medio de <i>Ae. aegypti</i>	37
Figura 14. Pools de huevos de la cepa Cali-MIB de <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 15. Productos de RT-PCR obtenidos con gradiente de temperatura.	41
Figura 16. Montaje de microinyección.....	42
Figura 17. Inmunofluorescencia en muestras empleadas para la alimentación de mosquitos.....	45
Figura 18. Resultados cualitativos de los productos de RT-PCR para los extraídos de RNA de la cepa Cali-S de <i>Ae. aegypti</i>	47
Figura 19. Fenotipos obtenidos por RT-PCR de la cepa Cali-S de <i>Ae. aegypti</i>	47
Figura 20. Productos de RT-PCR para los extraídos de RNA en intestinos de la cepa Cali-MIB de <i>Ae. aegypti</i>	48
Figura 21. Fenotipo de las muestras evaluadas de Cali-MIB por RT-PCR ..	48
Figura 22. Resultado de RT-PCR en huevos de la progenie de la cepa Cali-S de <i>Ae. aegypti</i>	49
Figura 23. Evaluación de la transmisión vertical en huevos de la progenie de la cepa Cali-MIB de <i>Ae. aegypti</i>	50
Figura 24. Resultado de secuencias similares a las secuenciadas del producto de RT-PCR del sobrenadante del virus dengue-2, pase 4.....	51

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula para determinar la concentración del DENV-2..... 36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estandarización de extracción de RNA en estadios inmaduros (huevos) de la cepa Rockefeller de <i>Ae. aegypti</i>	44
Tabla 2. Titulación del virus dengue-2 al cual fueron expuestos los mosquitos de las cepas Cali-S y Cali-MiB de <i>Ae. aegypti</i>	45
Tabla 3. Determinación de tasa de infección del DENV-2 en las cepas Cali-MIB y Cali-MIB de <i>Ae. aegypti</i>	46
Tabla 4. Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de <i>Ae. aegypti</i>	49

RESUMEN

El dengue es una de las enfermedades infecciosas transmitidas por artrópodos que afecta a millones de personas en el mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. El agente causal de la enfermedad es el virus dengue (DENV) (serotipos 1 a 4), transmitido generalmente a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (transmisión horizontal). Uno de los aspectos importantes para la transmisión del DENV es la competencia vectorial, definida como la capacidad del vector para replicar y transmitir el virus a un huésped, y está restringida a factores genéticos propios del vector, por lo tanto, en la naturaleza se presentan cepas de mosquitos que difieren en su susceptibilidad a la infección por el virus. Sin embargo, se ha observado la incidencia del virus en condiciones adversas para su transmisión horizontal, una explicación a ello es que esté ocurriendo transmisión vertical (TV) del virus (transmisión del virus de parentales a su progenie). En este estudio, se evaluó la TV del virus dengue-2 en dos cepas de *Ae. aegypti* que difieren en su susceptibilidad a la infección por el virus (Cali-S y Cali-MIB) a través de RT-PCR con RNA extraído de huevos de la progenie de las cepas del vector, con el fin de encontrar una posible relación entre la TV del DENV-2 y el fenotipo de las cepas de *Ae. aegypti*.

Palabras claves: Dengue, transmisión vertical, competencia vectorial, *Aedes aegypti*.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por vectores constituyen una problemática de salud pública mundial, y causan diversas epidemias que alteran la seguridad sanitaria de todos los seres humanos (Campbell-Lendrum et al., 2015). Dentro de estas enfermedades, se encuentra el dengue, una infección vírica que contribuye significativamente a la carga de morbilidad en el mundo (Campbell-Lendrum et al., 2015).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el dengue es una enfermedad febril, considerada como un desafío de Salud Pública en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, principalmente en zonas urbanas y semiurbanas (Hasan et al., 2016). Adicional a esto, la OMS estima que más de 50 millones de infecciones por el virus dengue (DENV) y 20000 muertes relacionadas con la enfermedad ocurren anualmente en el mundo, siendo los países con bajos recursos los más vulnerables a la transmisión del virus (Villar et al., 2015).

Específicamente para Colombia, uno de los países de las Américas más afectado por las epidemias del dengue, la tasa de incidencia de la enfermedad ha sido fluctuante desde 1978 con tendencia al incremento a través del tiempo (INS, 2016). Actualmente, la infestación por *Ae. aegypti* es generalizada y la enfermedad del dengue es endémica en la mayor parte del país (Villar et al., 2015).

El dengue es causado por el virus con el mismo nombre (DENV), el cual pertenece al género *Flavivirus* de la familia Flaviviridae y al grupo de los Arbovirus (Hasan et al., 2016). Existen cuatro serotipos del virus dengue DENV: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4), denominados serotipos debido que cada uno tiene diferentes interacciones con los anticuerpos en el suero sanguíneo humano (Rothman, 2004). Los cuatro serotipos comparten aproximadamente 65% de similitud en sus genomas (Rothman, 2004). Estos serotipos del DENV son transmitidos a humanos a través de mosquitos del género *Aedes*, siendo *Aedes aegypti* el principal vector del virus (Hasan et al., 2016). En cuanto al ciclo de transmisión del DENV, el mecanismo más conocido es la transmisión horizontal (humano-mosquito-humano) (Pessoa et al., 2012); sin embargo, la transmisión vertical o transovarial, en la cual un mosquito hembra infectado por el virus puede transmitir éste a su progenie, sugiere ser un mecanismo que asegura el mantenimiento del virus durante condiciones adversas para la transmisión horizontal (Gutiérrez et al., 2017); también podría ser una posible influencia en la epidemiología en la infección por el virus dengue, aumentando la posibilidad de brotes de la enfermedad

viral en áreas endémicas y no endémicas (Gutiérrez et al., 2017; Khan et al., 2017 & Pessoa et al., 2012).

Actualmente, la única herramienta viable para la prevención de la enfermedad es el control vectorial mediante insecticidas y eliminación de criaderos, debido a que no hay una vacuna disponible ni un tratamiento médico específico para tratar el dengue (Pessoa et al., 2012). Sin embargo, se han llevado a cabo estudios enfocados a la interacción virus-vector en búsqueda de nuevas herramientas, que permitan disminuir la transmisión de la enfermedad.

En este mismo sentido, en el laboratorio Control de Vectores del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) se han seleccionado e identificado dos cepas de *Ae. aegypti* presentes en la naturaleza, con diferencias en su susceptibilidad hacia la infección por el DENV (Caicedo et al., 2013); una cepa susceptible Cali-S (98%) y otra refractaria Cali-MIB (40 %), las cuales han sido útiles para desarrollar investigaciones dirigidas a explorar los mecanismos en el vector asociados a la infección con virus dengue-2 (Ocampo & Weson, 2004). Con base en lo anterior y teniendo en cuenta la importancia clínica y epidemiológica del DENV en Colombia, en este estudio se evaluó la transmisión vertical del virus dengue-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, con el fin de conocer si sus diferencias en la susceptibilidad hacia la infección por el virus (susceptible y refractaria) se mantiene a través de este mecanismo de transmisión viral.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema de investigación y justificación

El dengue es una enfermedad infecciosa viral causada por cuatro serotipos distintos del virus con el mismo nombre (DENV 1-4) y es transmitido a humanos a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti* y en menor medida por *Aedes albopictus* (Hasan et al., 2016; Guzmán et al., 2010). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad del dengue ha sido considerada como un problema de salud pública en el mundo, donde anualmente ocurren más de 50 millones de infecciones por DENV y 20000 muertes se relacionan con la enfermedad (Villar et al., 2015).

La alta incidencia de la enfermedad del dengue en el mundo, sobretodo en regiones tropicales y subtropicales, se debe a varios factores, como lo son la expansión de las poblaciones urbanas (urbanización incontrolada), turismo, cambio climático y escasez e ineficiencia de programas enfocados al control vectorial (Diamond & Pierson, 2015). Como resultado de esto, el DENV se ha convertido en la principal causa de enfermedades virales transmitidas por artrópodos en el mundo (arbovirosis), y aproximadamente 3600 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad viral (Diamond & Pierson, 2015).

Las epidemias del DENV ocurren anualmente en las Américas, Asia, África y Australia y más de 100 países se ven afectados por éstas mismas, las cuales no sólo tienen un impacto negativo en la salud pública, sino también económico (Diamond & Pierson, 2015). Colombia no es ajena a este flagelo, considerada históricamente como uno de los países de las Américas más afectados por las epidemias del dengue. Actualmente, la enfermedad viral es endémica en la mayor parte del país (Villar et al., 2015). Dicha tasa de incidencia está influenciada por factores como la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus, la infestación por *Ae. aegypti* en más de 90% del territorio nacional situado por debajo de los 2.200 msnm, urbanización incontrolada y el aumento de la población con viviendas inadecuadas, entre otros (Minsalud, 2013; INS, 2017).

Ante la ausencia de una vacuna eficaz y la falta de un tratamiento efectivo para la enfermedad, el control de los mosquitos es una opción viable para interrumpir la transmisión de los serotipos del virus que causan la enfermedad (OMS, 2016). En los últimos años se han dado a conocer grandes avances enfocados al conocimiento de esta enfermedad, sobretodo en el desarrollo de vacunas, caracterización de la respuesta inmune y en las propiedades

moleculares del virus (Caicedo, et al., 2013). Sin embargo, aún se desconocen varios aspectos en relación a la transmisión del virus (Caicedo, et al., 2013).

En cuanto al proceso de transmisión del virus, son dos los mecanismos por los cuales ésta se puede llevar a cabo: la transmisión horizontal (humano-mosquito) y la transmisión vertical (mosquito-progenie) (Pessoa et al., 2012). Esta última, al tener alta probabilidad de convertirse en un reservorio de virus durante los periodos interepidémicos ha generado la necesidad de dirigir la atención al control de estadios tempranos de desarrollo del mosquito (larvas y pupas). Sin embargo, no es claro cuán presente está la transmisión vertical del DENV-2 en la naturaleza, y su importancia en la epidemiología de la enfermedad aún se debate (Grunnill & Boots, 2015).

En el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) se han desarrollado investigaciones dirigidas al estudio de relaciones virus-vector, orientadas a la respuesta inmune de *Ae. aegypti* durante la infección con el DENV (Ocampo & Weson, 2004). Para ello, han identificado y seleccionado dos cepas de este vector con diferente susceptibilidad o competencia vectorial a la infección por el virus, a partir de mosquitos colectados en la ciudad de Cali (Caicedo et al., 2013). Una cepa Susceptible (Cali-S, 96%) y otra refractaria con barrera a la infección en el intestino medio (Cali-MIB, 40%) (Caicedo, et al., 2013).

Estas cepas de *Ae. aegypti* pueden ser útiles en la caracterización de la transmisión vertical del virus dengue por las diferencias en la competencia vectorial asociados a su fenotipo, permitiendo simular condiciones naturales en cuanto al comportamiento de la transmisión en la ciudad de Cali (Ocampo & Weson, 2004). Bajo este contexto, este proyecto pretende evaluar la transmisión vertical del DENV-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Aedes aegypti* simulando condiciones naturales de infección en laboratorio. Esto con el fin de darle respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿Existe transmisión vertical de DENV-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*?

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1 *La enfermedad del dengue:*

El dengue, también conocida como la fiebre del dengue, es una enfermedad infecciosa viral tropical, causada por el virus con el mismo nombre (DENV 1-4) y transmitida a través de la picadura de mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti* (Heilman et al., 2014; Guzmán et al., 2010). La enfermedad ocurre principalmente en las regiones ecuatoriales de África, América, sudeste de Asia y Pacífico occidental, convirtiéndose en un problema de salud pública en el mundo (Heilman et al., 2014).

Se reconoce un espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad, desde asintomático hasta altas fiebres, dolores musculares y articulares, mialgias, erupciones cutáneas y fiebres hemorrágicas (dengue grave) (Hasan et al., 2016 & Heilman et al., 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el dengue, de acuerdo a su curso clínico, puede clasificarse como dengue con o sin signos de alarma y dengue grave (OMS, 2017). Estos síntomas se pueden presentar en individuos de todas las edades, sin embargo están condicionados al estado inmunológico de cada persona y pueden variar de acuerdo a la gravedad de la enfermedad (Hasan et al., 2016 & Guzmán et al., 2010).

Una infección causada por alguno de los serotipos del DENV conlleva a una inmunidad permanente contra una nueva infección por el mismo (OMS, 2017; Murrell, Wu & Butler, 2011). No obstante, infecciones sucesivas con diferente serotipo del virus representa un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (OMS, 2017). Actualmente no hay medicamentos específicos o vacunas disponibles para tratar la enfermedad y el diagnóstico se basa en pruebas serológicas (prueba ELISA) y pruebas moleculares (PCR) (Hasan et al., 2016; Guzmán et al., 2010).

2.2.2 *El virus dengue:*

El virus dengue (DENV) pertenece a la familia Flaviviridae y al género *Flavivirus* (Screaton et al., 2015). Existen cuatro serotipos inmunológicos del DENV (DENV1-4), los cuales comparten analogías estructurales y patogénicas, por lo que cualquiera de ellos puede producir las formas graves de la enfermedad (Martínez, 2008; Murrell, Wu & Butler, 2011); sin embargo, los serotipos 2 y 3 se han relacionado con la mayor cantidad de casos graves (Martínez, 2008; Murrell, Wu & Butler, 2011).

El DENV presenta un genoma RNA con polaridad positiva, con un tamaño alrededor de 11000 bases de nucleótidos, el cual codifica una sola poliproteína que se escinde tras la traducción en 3 moléculas estructurales de proteínas (cápside C, proteína de membrana M y proteína de envoltura E) y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5). Estas últimas, sólo se encuentran en las células huésped infectadas y son necesarias para la replicación viral (Guzmán et al., 2010; Heilman et al., 2014 & Screaton et al., 2015).

El DENV además presenta una estructura esférica con un diámetro de 50nm, un núcleo denominado nucleocápside, compuesto por el genoma viral y la cápside (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005) (**Figura 1**). Esta estructura se caracteriza también por estar rodeada por una envoltura viral, la cual es una bicapa lipídica obtenida de la célula huésped. En dicha envoltura se encuentran incrustadas las proteínas de envoltura (E) y de membrana (M). Estas dos proteínas forman por su parte una capa protectora externa y de esta manera controlan la entrada del virus en las células humanas (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005).

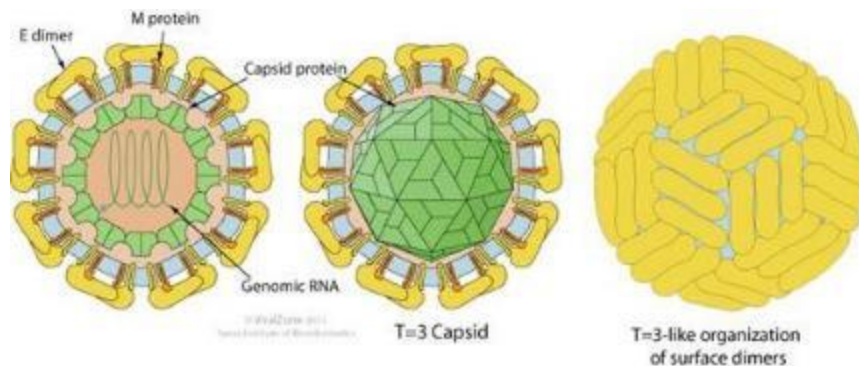


Figura 1. Estructura del virus dengue. El DENV presenta una estructura esférica, compuesta por genoma viral (RNA) y proteínas estructurales (E, M y C) (EME1, 2012).

Al igual que otros virus, el DENV sólo puede replicarse dentro de un organismo huésped, para esto ingresa a la célula huésped a través de endocitosis, gracias a la interacción entre la proteína de envoltura E con proteoglicanos de la membrana celular de la célula huésped (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005; Velandia & Castellanos, 2011). Una vez dentro de la célula, el virus se fusiona con la membrana endosomal y se libera en el citoplasma la nucleocápside del virus (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005). Esta liberación al citoplasma parece ser dependiente del pH, ya que las condiciones ácidas activan la fusión de la proteína de envoltura E con la membrana endosomal y provocan cambios conformacionales en la proteína de envoltura, lo cual permite la liberación de la nucleocápside al citoplasma (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005).

Una vez la nucleocápside se encuentra en el citoplasma, el RNA viral es liberado para iniciar los procesos de replicación y traducción (Velandia & Castellanos, 2011). En cuanto a la replicación del DENV, es un proceso que no está totalmente entendido (Velandia & Castellanos, 2011). Sin embargo, se sabe que el genoma viral se replica y se ensambla en el retículo endoplasmático de la célula huésped (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005). Posteriormente, estas partículas virales inmaduras son transportadas a través de la red trans-Golgi, donde maduran y se convierte en su forma infecciosa. Por último, los virus maduros se liberan de la célula e infectan a otras a través de exocitosis (**Figura 2**) (Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann, 2005).

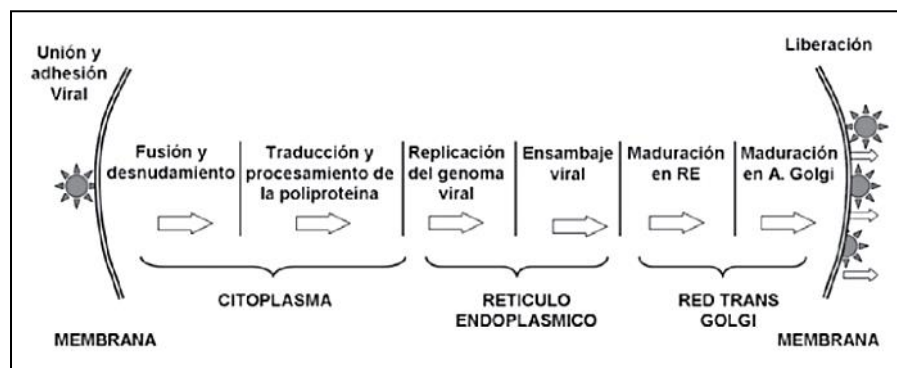


Figura 2. Diagrama del ciclo intracelular del DENV. El diagrama muestra la localización subcelular para cada uno de los eventos necesarios para la replicación y traducción del RNA viral (Velandia & Castellanos, 2011).

Tras la infección con DENV en humanos, hay un periodo de incubación del virus que promedia entre 4 a 7 días (Murrell, Wu & Butler, 2011). En este periodo de tiempo, el virus se replica en las células dendríticas (CD), también infecta a los macrófagos, linfocitos, y finalmente al torrente sanguíneo (Murrell, Wu & Butler, 2011). Por su parte, las células dendríticas son células presentadoras de antígeno esenciales para inducir una respuesta inmune (Murrell, Wu & Butler, 2011). Se cree que el DENV se dirige preferentemente a estas células, especialmente a las CD derivadas de monocitos y células de Langerhans presentes en la piel humana (Murrell, Wu & Butler, 2011).

2.2.3 El vector:

El virus dengue (DENV: 1-4) se transmite por mosquitos del género *Aedes*, siendo *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* los vectores para la transmisión del DENV; sin embargo *Ae. aegypti* es el vector principal del virus (Carrington & Simmons, 2014). *Ae. aegypti* es un díptero perteneciente a la familia Culicidae, con preferencia a estar dentro y alrededor de viviendas (endofílico) de regiones tropicales y subtropicales del mundo, con un amplio rango de distribución en estas regiones y con predominancia en zonas urbanas y algunas áreas rurales (CDC, 2012; Carrington & Simmons, 2014).

En su morfología de estadio adulto, las hembras *Ae. aegypti* son más grandes que los machos y ambos presentan escamas blancas en la superficie dorsal del tórax (Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016). En cuanto a su alimentación, los machos toman néctar y las hembras son hematófagas, con preferencia por la sangre humana para el desarrollo de los ovarios, la embriogénesis y producción de huevos (Kraerme et al., 2015; Goindin et al., 2015; Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016). Este ciclo reproductivo que comienza con la ingesta de sangre humana y finaliza con la ovoposición de huevos se denomina ciclo gonotrófico (Goindin et al., 2015). Dichos huevos son depositados en recipientes con agua y si las condiciones de temperatura y humedad son favorables, estos eclosionan y se pasan a estadio de larva (CDC, 2012). Después de desarrollarse a través de cuatro estadios larvarios, éstas se transforman en pupas (CDC, 2012). Al igual que el estadio larvario, las pupas también se desarrollan en medio acuático, pero no se alimentan y se transforman a mosquitos adultos. Este ciclo puede tardar entre 8 y 10 días (Figura 3) (CDC, 2012). Es importante resaltar que los huevos tienen la capacidad de resistir desecación hasta por 6 meses y ser viables para la eclosión cuando se presentes condiciones adecuadas (CDC, 2012).

Respecto al hábitat, estos mosquitos viven en entornos tanto naturales como artificiales, incluidos terrestres o acuáticos (Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016). Las adaptaciones a los hábitats domésticos urbanos, han llevado a los mosquitos *Ae. aegypti* a utilizar una gama de contenedores artificiales conocidos como criaderos, que incluyen jarrones, tanques de agua y llantas (Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016). Por otra parte, la distribución mundial de *Ae. aegypti* está influenciada por factores climáticos, debido a que las temperaturas óptimas para su desarrollo, longevidad y fecundidad son 22°C y 32°C (Marinho et al., 2016). A temperaturas más elevadas, se favorece la supervivencia del vector, disminuyendo así el tiempo de ovoposición de huevos, reduciendo su periodo extrínseco de incubación del DENV y con ello aumentan las tasas de transmisión viral (Marinho et al., 2016).

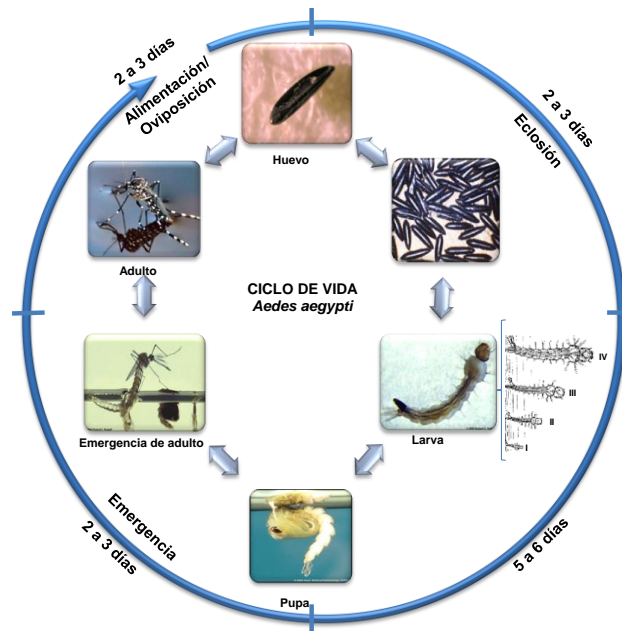


Figura 3. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. El ciclo de vida del mosquito inicia en huevo, pasa a larva (estadio I-IV), luego a pupa y por último a adulto. Los estadios inmaduros son acuáticos (Caicedo PA et al, 2016).

2.2.4 Historia y epidemiología del dengue:

Las primeras epidemias de dengue datan de 1779-1780 en Asia, África y América del Norte, ampliamente distribuidas en las áreas tropicales durante más de 200 años (CDC, 2015). Esta amplia distribución de las epidemias se vio influenciada por la Segunda Guerra Mundial, con la dispersión de tropas entre países a través del transporte marítimo, lo cual favoreció la infestación del vector en destinos costeros (Murray, Quam & Wilder-Smith, 2013). Con el final de la guerra, el transporte y la rápida urbanización condujeron a una mayor transmisión del virus e hiperendemicidad de la enfermedad (presencia de serotipos múltiples) en la mayoría de países del sudeste asiático (Murray, Quam & Wilder-Smith, 2013).

Se cree que en 1970, sólo el DENV-2 estaba presente en el continente Americano, pero es probable que el DENV-3 haya tenido una distribución puntual en Colombia y Puerto Rico (CDC, 2015). En cuanto a los otros serotipos del virus, en 1977 se introdujo a la región el DENV-1, el cual causó grandes epidemias por un período de 16 años y el DENV-4 se introdujo en 1981, causando epidemias generalizadas en el continente Americano (CDC, 2015).

En las últimas décadas ha aumentado la incidencia de dengue en el mundo, con un número de casos insuficientemente notificados y mal clasificados (OMS & OPS, 2016). Antes de 1970, sólo nueve países habían sufrido epidemias de Dengue grave, ahora la enfermedad es endémica en más de 100 países de las regiones de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental; siendo las Américas, Asia Sudoriental y el Pacífico, las regiones más gravemente afectadas por la enfermedad (OMS & OPS, 2016). Se estima que a nivel mundial se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año. Sin embargo, la carga total de la enfermedad a nivel mundial es incierta (OMS & OPS, 2016).

En Colombia los inicios del dengue se basan en la dispersión de mosquitos *Ae. aegypti*, probablemente importado del África, en los barcos con esclavos que venían a Cartagena (Padilla, Rojas & Sáenz-Gómez, 2012). Posteriormente, al establecerse la navegación por la ruta del río Magdalena, el vector se introdujo al interior del país (Padilla, Rojas & Sáenz-Gómez, 2012). A mediados de los años cincuenta, antes de emprender la campaña de erradicación de *Ae. aegypti*, el dengue era endémico en el país y 28% del territorio se encontraba infestado por este vector (Padilla, Rojas & Sáenz-Gómez, 2012). En Colombia, se presenta una incidencia de 366,2 casos por 100000 habitantes en riesgo (población de área urbana), siendo Boyacá, Guainía, Cundinamarca, Putumayo, Valle del Cauca, Vichada, Tolima, Antioquía, Guaviare y Quindío, localidades con el mayor número de casos de la enfermedad (INS, 2016). Adicional a esto, de acuerdo al Instituto Nacional de Salud (INS), en la semana epidemiológica 52 de 2016 se notificaron al SIVIGILIA 103822 casos de Dengue, de los cuales el 50% son sin signos graves, 40% con signos graves y el 1% de Dengue grave (INS, 2016).

2.2.5 Control vectorial

Las enfermedades causadas por patógenos transmitidos por vectores pueden prevenirse aumentando la inmunidad en el huésped a través de vacunas o mediante control vectorial (Weeratunga et al., 2017). Específicamente para la enfermedad del dengue no hay una vacuna disponible, por lo que el control vectorial es el principal método para prevenir la transmisión del virus (Samuel et al., 2017).

Respecto al control vectorial, se han implementado diferentes formas de control para *Aedes* spp, entre las que se encuentran las intervenciones químicas (insecticidas y larvicidas), eliminación de criaderos, larvicidas no químicas (peces larvívoros) y técnicas genéticas (Weeratunga et al., 2017). En primer lugar, los insecticidas químicos (piretroides, carbamatos, organofosforados y organoclorados) han servido como pilares para el control vectorial de *Ae. aegypti* en estadios larvarios y adultos, mediante la fumigación

en espacios interiores y exteriores (Weeratunga et al., 2017). En cuanto a la eliminación de criaderos, éste se basa en eliminar los sitios de reproducción del vector en aguas estancadas, para ello se hace pertinente la participación de la comunidad (Nogueira et al., 2017). Con el mismo fin de erradicar el vector, los insecticidas no químicos utilizan peces larvivoros (generalmente *guppies*) y copépodos depredadores (pequeños crustáceos de agua dulce) (OMS, 2017). Finalmente, a través de ingeniería genética se generan mosquitos transgénicos, portando un alelo letal dominante capaz de matar a las siguientes generaciones de *Aedes* spp (Nogueira et al., 2017). Otros métodos de control de la población son generar mosquitos con *Wolbachia* spp, la cual es una bacteria que se transmite a las siguientes generaciones de mosquitos, reduciendo de esta manera su capacidad de infectarse con virus dengue (Weeratunga et al., 2017).

2.2.6 Interacción virus-vector:

Las enfermedades por patógenos transmitidos por vectores artrópodos (arbovirosis), constituyen un problema de salud pública mundial, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo debido a sus características ambientales que favorecen la supervivencia del vector (Quintero, Osorio & Martínez, 2010). Existen múltiples factores que facilitan la transmisión de estas enfermedades, una de ellas es la competencia vectorial (CV) definida como la habilidad o permisibilidad extrínseca de un vector artrópodo a la infección, replicación y transmisión de un virus (Caicedo et al., 2013; Black et al., 2002). Por lo tanto, la CV está restringida exclusivamente a la interacción vector-patógeno, por lo que la CV depende de factores propios del vector (factores genéticos) y ambientales (Caicedo et al., 2013).

En cuanto a *Aedes aegypti*, principal vector del virus dengue, su competencia vectorial varía geográficamente y se ve afectada por factores genéticos y ambientales (Caicedo et al., 2013). Una baja CV o refractoriedad de *Ae. aegypti* a la infección por el DENV está asociada a las diferentes barreras que impiden que el virus se replique y se disemine en el vector (Caicedo et al., 2013). La primera barrera a la que se debe enfrentar el virus es la barrera del intestino medio (MIB), en donde el virus se uniría a ciertos receptores que se encuentran en la superficie celular del epitelio del intestino, seguidamente se encuentra la barrera de escape a este mismo órgano (MEB) (Caicedo et al., 2013) (**Figura 4**); si el virus logra infectar y replicarse dentro de estas células epiteliales, las nuevas partículas virales se difundirán a través del hemocele e infectarán tejidos secundarios hasta llegar a las glándulas salivares del mosquito y podrá infectar a un nuevo huésped (Carrington & Simmons, 2014).

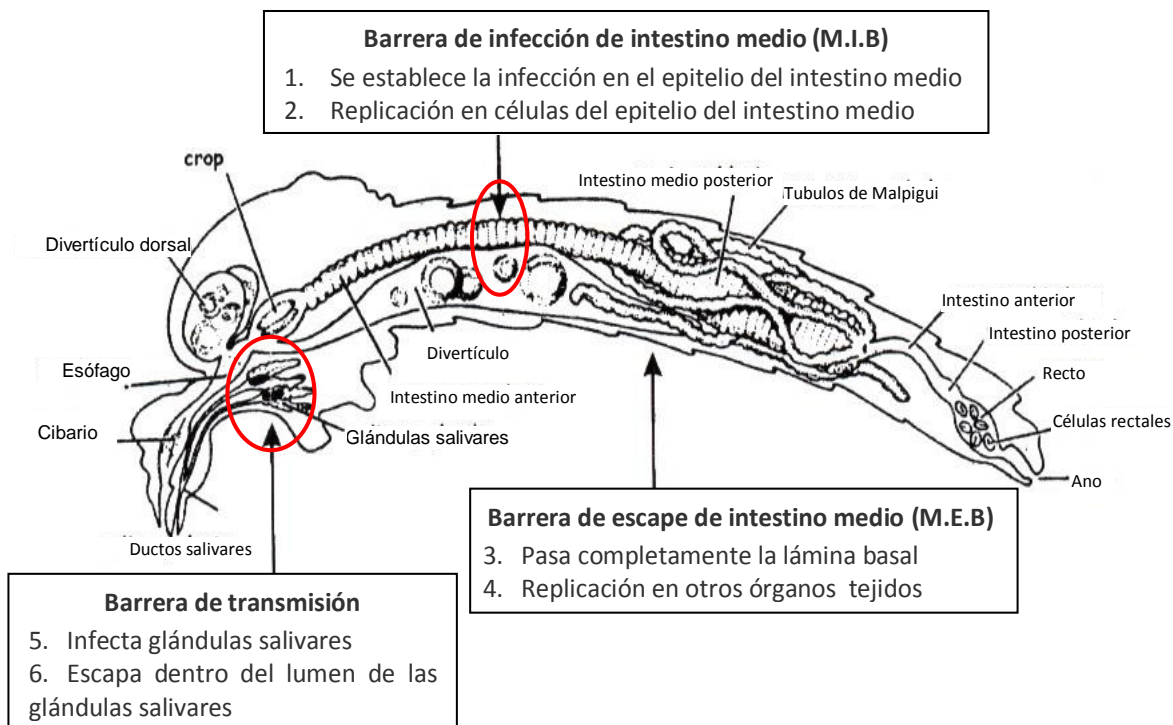


Figura 4. Barreras anatómicas en *Aedes aegypti* a la transmisión del DENV. Después de una ingesta de sangre, el DENV debe infectar primero las células epiteliales del MIB de *Ae. aegypti*. Si logra escapar a esta barrera, los viriones infecciosos pueden diseminarse a órganos secundarios hasta llegar a glándulas salivares (Black et al, 2002. Modificado).

Bajo este contexto, comprender los factores genéticos asociados a la CV y los factores que controlan las barreras de infección viral contribuiría al diseño de nuevas estrategias alternativas para disminuir la transmisión del virus (Caicedo PA, et al., 2013). En el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), se han seleccionado tres cepas: susceptible (Cali-S) (96,4% susceptible), Refractaria con barrera de escape de miocardio (Cali-MEB) (44,1% refractaria) y Refractaria con barrera de infección de intestino medio (Cali-MIB) (40% refractaria), sugiriendo que la CV está asociada con múltiples genes y factores que tienen efectos aditivos sobre la susceptibilidad a la infección por el virus Dengue (Caicedo PA, et al., 2013).

Otros aspectos que afectan la susceptibilidad del virus Dengue en mosquitos *Ae. aegypti* son la concentración del virus, el periodo extrínseco de incubación, en el cual el virus se replica durante un periodo de 4-12 días en el vector, y la temperatura ambiental, debido a que cuanto más baja sea la temperatura, más tiempo se necesita para que el virus se replique a concentraciones suficientemente altas para ser transmisible, pero a temperaturas elevadas las tasas de replicación de virus son mayores, y el

tiempo mínimo para que el mosquito pueda completar su periodo de incubación extrínseco disminuye (Carrington & Simmons, 2014).

2.2.7 Transmisión vertical del virus dengue:

La transmisión de patógenos de huésped a huésped se clasifica como horizontal (TH) o vertical (TV), independientemente de la ruta física de transmisión (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). Por un lado la TH abarca los modos de transmisión no parental, por el contrario la TV, también llamada transmisión hereditaria, se refiere a la transmisión del patógeno de padres a hijos (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). Ambas formas de transmisión no son mutuamente excluyentes y una combinación de ambas (transmisión en modo mixto), es común en eucariotas, bacterias y virus (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016).

Los arbovirus se mantienen principalmente mediante la transmisión horizontal, en donde los vectores (artrópodos) se infectan durante la alimentación de sangre en un vertebrado y, después de un periodo de incubación dentro del vector, el virus puede infectar a un nuevo huésped durante una subsiguiente ingesta de sangre por parte del vector (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). A pesar de que esta transmisión aporta en la explicación de la epidemiología del dengue y de otras enfermedades víricas, no se entiende con claridad el mantenimiento de arbovirus en zonas endémicas durante condiciones adversas para las actividades de los vectores, como lo son las estaciones secas en las zonas tropicales y las fumigaciones con insecticidas, las cuales pueden reducir la densidad de los vectores (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). Ante esta situación, varias hipótesis se han propuesto para explicar estos acontecimientos, entre las que se encuentra la transmisión vertical de arbovirus en los vectores (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016).

Por tanto, la transmisión vertical, la cual se define como la proporción de insectos hembras infectadas que producen al menos una descendencia infectada (Grunnill & Boots, 2015), es un mecanismo para el mantenimiento de arbovirus en la naturaleza durante condiciones ambientales adversas para que se dé la transmisión horizontal (Grunnill & Boots, 2015). En los mosquitos este fenómeno se produce a través de dos mecanismos principales: la transmisión transovariana, mediante la cual el virus infecta los tejidos germinales de los mosquitos hembra, y la transmisión trans-huevo, por el que el virus infecta el huevo durante la ovoposición (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). De esta manera, los arbovirus pueden persistir durante periodos desfavorables a través de la infección de huevos, larvas o adultos, sin necesidad de la transmisión horizontal (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). Sin embargo, existe una gran controversia sobre la importancia epidemiológica que requiere la transmisión vertical, esto se debe a las bajas tasas estimadas

de transmisión vertical para explicar el mantenimiento a largo plazo de arbovirus, como el dengue, en la naturaleza. Asimismo, existen discrepancias entre los estudios de campo y laboratorio para explicar la transmisión vertical (Grunill & Boots, 2015).

2.3 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la transmisión vertical del DENV-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*.

Objetivos específicos

Para Diciembre del 2017:

1. Estandarizar la extracción de RNA en estadios inmaduros (huevos) de *Ae. aegypti*.
2. Evaluar la infección por DENV-2 en la progenie (huevos) de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*.

2.4 METODOLOGÍA UTILIZADA

2.4.1 Mantenimiento de mosquitos *Ae. aegypti*:

✓ Obtención de mosquitos adultos *Aedes aegypti*

Los ejemplares de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Aedes aegypti* utilizados en este estudio fueron mantenidos en el insectario del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), el cual cuenta con las normas de bioseguridad (BSL+2) necesarias para llevar a cabo el procedimiento bajo condiciones estándar de laboratorio: Temperatura (24°C-28°C), humedad relativa (70%-80%) y fotoperiodo (12:12).

Para la obtención de mosquitos adultos de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, se eclosionaron huevos de ambas cepas previamente almacenados en el insectario de CIDEIM. Para ello, los huevos (**Figura 5,A**) fueron colocados en bandejas de plástico en 1L de agua declorada para su eclosión (**Figura 5,B**).

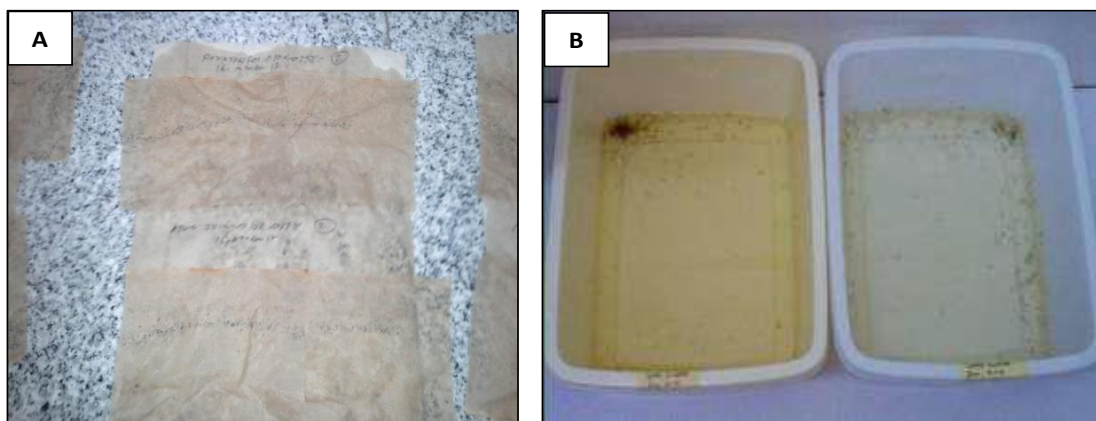


Figura 5. Mantenimiento de estadios inmaduros de *Ae. aegypti*. Huevos de *Ae. Aegypti* contenidos en servilletas (**A**) y eclosión de huevos en bandejas de plástico con agua declorada para obtención de larvas (**B**).

Después de la eclosión de los huevos, las larvas emergieron en las bandejas de plástico, las cuales estuvieron cubiertas con una malla de tela para evitar posibles contaminaciones. Al emerger las larvas (estadio I-IV), éstas se alimentaron con una solución de hígado (DIFCOTM liver), la cual fue añadida con un gotero a los contenedores de plástico. Una vez obtenidas las pupas, éstas fueron colocadas en un vaso plástico con agua, el cual fue puesto en una jaula para que estas emergieran, este estadio no requiere de alimentación

por lo tanto, posterior a esta actividad se espera la emergencia de los adultos. Una vez se obtuvieron los adultos, en la parte posterior de la jaula se colocó un algodón, al cual diariamente se le añadió solución azucarada con una pipeta Pasteur (**Figura 6**).

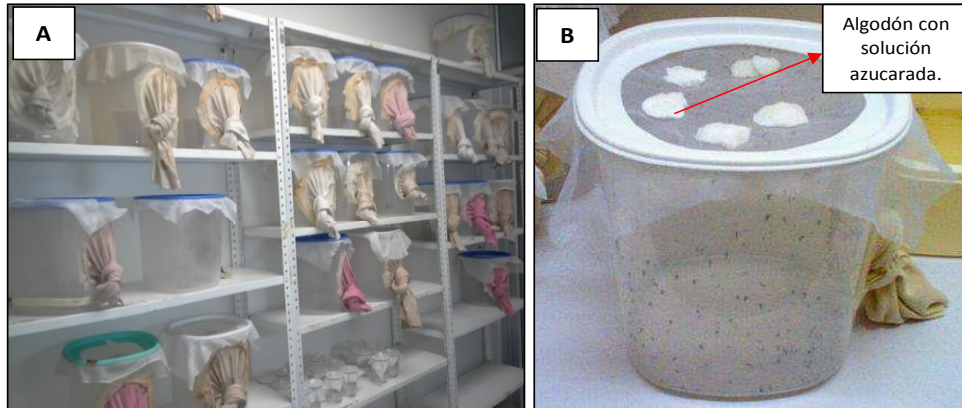


Figura 6. Mantenimiento de mosquitos *Ae. aegypti*. Las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* fueron mantenidos en el insectario de CIDEIM (**A**), en donde cada una de las cepas se mantuvo en jaulas de plástico con malla (**B**).

Parte de estos mosquitos fueron empleados para el desarrollo de este proyecto, y otra parte para realizar alimentación artificial con sangre a través de un sistema de membrana, con el fin de obtener huevos y así mantener las cepas. En general, los mosquitos de ambas cepas fueron alimentados artificialmente con sangre sola de conejo a través de un sistema de membrana que representa condiciones naturales de alimentación (**Figura 7**). Dichos mosquitos alimentados para cada una de las cepas de *Ae. aegypti*, fueron colocados en su respectiva jaula de plástico con malla, rotulada con la fecha de alimentación y el nombre de la cepa.

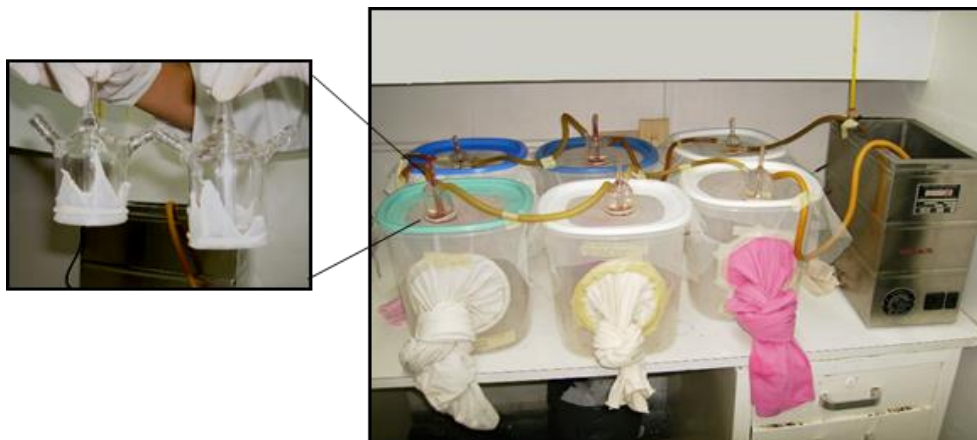


Figura 7. Equipo de alimentación artificial con alimentadores de vidrio. Para la obtención de huevos, las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* fueron alimentadas a través de un sistema de membrana, simulando condiciones naturales de infección (Caicedo, 2008).

Para la colección de huevos, cada una de las jaulas contuvo en su interior una superficie sólida (papel) y un vaso de plástico mediano con agua a la altura del papel para la ovipuesta de los huevos, la cual inicia aproximadamente a los tres días de post-alimentación (**Figura 8**). Una vez obtenidos los huevos, el papel fue retirado de cada una de las jaulas y pasaron por un proceso de secado por 48 horas. Transcurrido este tiempo, los huevos fueron almacenados en el insectario a una temperatura de 25 a 28°C y una humedad relativa de 70%, envueltos en un papel y debidamente rotulados con la fecha de oviposición y el nombre de la cepa.

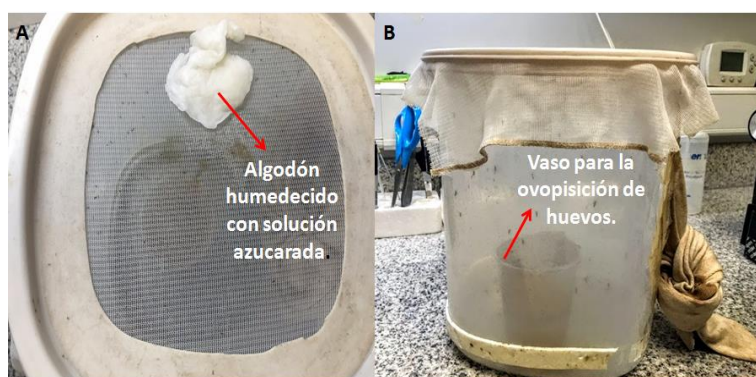


Figura 8. Mantenimiento de los mosquitos *Ae. aegypti* para la colección de huevos. Para la ovoposición de huevos, las jaulas contienen en su interior un vaso plástico con agua y dentro de éste una servilleta a la altura del vaso (**B**) y para la alimentación de los se tuvo encima de la malla de la jaula un algodón humedecido con solución azucarada (**A**).

2.4.2 Estandarización de la extracción de RNA en estadios inmaduros (huevos) de *Ae. aegypti*

Para dar respuesta a la pregunta de investigación basada en si ocurre o no transmisión vertical del DENV-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, es necesario realizar extracción de RNA en los huevos de la progenie de dichas cepas de *Ae. aegypti* para realizar una posterior RT-PCR. Por lo tanto fue necesario realizar la estandarización de extracción de RNA en huevos de mosquitos Rockefeller, los cuales son una cepa de referencia de *Ae. aegypti*, que ha sido colonizada en el laboratorio de control de vectores en CIDEIM.

Para realizar la estandarización, se tomaron por duplicado pools de 5, 10 y 15 huevos de la cepa Rockefeller, para esto fue necesario verificar la viabilidad de estos mismos verificando su forma ovalada en el estereoscopio. Una vez seleccionados los huevos en pool, se tomaron con un pincel y fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL rotulados con su respectivo número de huevos, para su posterior extracción de RNA siguiendo un protocolo con trizol® Reagent, llevado a cabo en una cabina de extracción.

El protocolo con trizol se basó en agregar primero 100µL de este reactivo a cada tubo eppendorf de 1.5 mL, con una continua maceración de los huevos utilizando un macerador pequeño de plástico. Seguidamente, se añadieron 200µL de trizol y nuevamente se maceraron los huevos. Al terminar la maceración, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, a cada una de las muestras se le añadió 100µL de cloroformo, se mezclaron suavemente y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para una posterior centrifugación a 12000 gravedades o rcf durante 15 minutos a 4°C. Finalizada esta centrifugación, se observó en cada tubo eppendorf dos fases: una fase acuosa transparente (RNA) y otra orgánica rosada (proteínas). Posteriormente, en cada una de las muestras se tomó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL igualmente rotulado con el número de huevos. Terminada la transferencia de la fase acuosa, para cada caso se agregaron 250µL de isopropanol, nuevamente se mezcló suavemente y las muestras se llevaron a centrifugar a 12000 gravedades durante 10 minutos a 4°C. Terminada esta centrifugación, el sobrenadante fue eliminado y a cada tubo eppendorf se le agregó 1mL de etanol frío al 75% y se centrifugó a 7500 gravedades por 10 minutos a 4°C. Finalizada la centrifugación, el sobrenadante fue descartado y los tubos eppendorf se colocaron en una servilleta destapados boca abajo para remover los restos de etanol. Una vez no se observaron restos de etanol, el pellet fue resuspendido en 15µL de agua libre de RNAsas y las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -80°C. Finalizadas las extracciones, se cuantificó la cantidad de RNA en el Nanodrop.

2.4.3 Identificación del DENV-2 en las cepas CALI-S y CALI-MIB de *Ae. aegypti*.

Para la identificación del DENV-2 en mosquitos adultos de las cepas CALI-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, éstos primero fueron alimentados artificialmente a través de un sistema de membrana con sangre mezclada con DENV-2, previamente aislado de un cultivo celular C6/36 HT y posteriormente titulado para determinar su concentración. Seguidamente, con el fin de conocer el fenotipo o competencia vectorial de los mosquitos alimentados, estos fueron individualizados y al transcurrir 15 días post-infección se les realizó disección de intestino medio para una posterior extracción de RNA y con ello, ejecutar una RT-PCR que permitiera la identificación del virus. A continuación se describe en cada ítem cada uno de los procesos nombrados anteriormente.

✓ Cultivo celular C6/36 HT

La línea celular C6/36 HT de *Aedes albopictus* fue utilizada en este estudio como sustrato para la replicación del virus dengue-2. Para ello, primero fue necesario realizar pase celular cada 8 días en flask de 50 mL hasta obtener una monocapa celular (**Figura 9, B**). Cada pase celular se llevó a cabo con el fin de preservar las propiedades fisiológicas de las células en cultivo *in vitro* y cada uno de éstos fue realizado en una cabina de flujo laminar; en donde inicialmente se descartó el contenido del flask, para un posterior desprendimiento celular con la ayuda de un policia de vidrio estéril en 1mL de medio L-15 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Se tomaron aproximadamente 15µL de dichas células, las cuales fueron transferidas a un nuevo flask de 50 mL. Posteriormente, a cada uno de los flask se les agregó 5mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10%, y fueron rotulados con el nombre de la línea celular, número de pase y la fecha en el que éste se realizó.

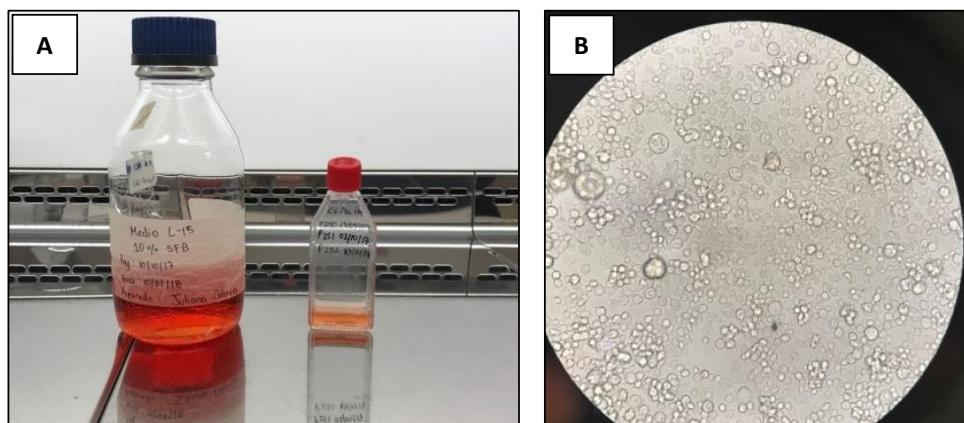


Figura 9. Cultivo celular C6/36. Flask de 50 mL con medio L-15 suplementado con SFB al 10% (A) y monocapa celular (vista desde el microscopio invertido), necesaria para la amplificación del DENV-2 (B).

Finalizado el pase celular, los flasks fueron incubados a una temperatura de $\pm 31^{\circ}\text{C}$ y se observó durante los 7 días siguientes el crecimiento celular hasta llegar a la obtención de una confluencia celular del 80%, verificada con la ayuda de un microscopio invertido. Una vez obtenida la monocapa celular, se procedió a realizar la infección celular con sobrenadante del virus dengue-2 (cepa Nueva Guinea “C”) en pase 4. Para esto, primero se descartó el contenido del flask y se tomaron 800 μL del sobrenadante del virus, los cuales fueron depositados en el flask para ser incubado a una temperatura de 37°C con agitación constante en el shaker por 1 hora. Transcurrido este tiempo, se eliminaron los restos del sobrenadante del virus y al flask se le adicionó 7 mL de medio nutritivo L-15 suplementado con SFB al 2%, para una posterior incubación a $\pm 31^{\circ}\text{C}$ durante 10 ± 15 días, el cual corresponde al periodo extrínseco de incubación del virus dengue-2. Por último, el flask fue rotulado con el número de pase celular, cepa del virus y fecha de infección. Terminado el periodo post-infección el virus fue tomado del flask para realizar las infecciones artificiales de los mosquitos.

✓ **Alimentación artificial de mosquitos hembras Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti***

Como se describió inicialmente, los mosquitos adultos de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* utilizados en este estudio fueron obtenidos del insectario de CIDEIM. Dichos mosquitos fueron alimentados artificialmente con sangre mezclada con virus dengue-2 de la cepa Nueva Guinea “C” en una proporción 1:1, el cual fue amplificado previamente en cultivo celular C6/36 HT.

En este estudio, se realizaron tres alimentaciones artificiales a través de un sistema de membrana, basado en utilizar un instrumento de vidrio en forma de campana en el cual la parte central presenta un espacio para el almacenamiento de sangre en la parte superior (**Figura 10, A**); la sangre se deposita con una pipeta Pasteur en dicho espacio, y posteriormente se cubre con un algodón. En cuanto a la parte inferior de la campana, ésta estuvo cubierta por una membrana de intestino de cerdo; se percató que dicha membrana quedara de forma templada y asegurada con un caucho. Adicional a esto, la campana presenta a cada lado ramificaciones para conectar mangueras por donde recircula agua a temperatura de 37°C, cuya función es darle temperatura corporal a la sangre (**Figura 10, B**). Cada una de las campanas de vidrio fue colocada encima de cada jaula específica de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* durante 2 horas, cubriendo las jaulas con bolsas negras.



Figura 10. Alimentación artificial de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Cada una de las alimentaciones artificiales se realizaron con sangre mezclada con DENV-2 a través de un sistema de membrana (**A**). Este sistema de membrana consistió en utilizar campanas de vidrio conectadas con mangueras, por donde fluía agua a 38°C (**B**). Se verificó que toda la membrana de cerdo quedara cubierta de la mezcla de sangre con DENV-2 (**C**).

Cabe destacar que la presencia y la concentración del DENV-2 en la sangre a la cual los mosquitos fueron expuestos se determinó en: **a)** sangre sin infectar, **b)** sobrenadante de virus y **c)** la mezcla de sangre y virus al inicio y al final del periodo de exposición como lo describe Caicedo P.A. et al. (2013). Estas titulaciones permitieron determinar la variabilidad en las concentraciones de virus que fueron tomadas por los mosquitos en las infecciones.

✓ **Individualización de mosquitos Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti***

Finalizada la alimentación artificial a través del sistema de membrana, se procedió a seleccionar con un aspirador los mosquitos hembras que tomaron la sangre mezclada con DENV-2. Para su selección, se observó que los mosquitos tuvieran el abdomen distendido y rojo.

Una vez las hembras alimentadas fueron seleccionadas y cuantificadas se transfirieron a través del aspirador a una jaula con malla. Seguidamente, con el mismo aspirador se procedió a individualizar las hembras en pequeños tarros plásticos con malla rotulados con el número y nombre de la cepa de *Ae. aegypti* (**Figura 11, A**). Dicha malla presentó un pequeño agujero sellado con un algodón, con fin de evitar la salida del mosquito y a su lado otro pequeño algodón, el cual diariamente se humedeció con una solución azucarada para su alimentación. Adicional a esto, al interior del pequeño tarro se colocó como base un algodón húmedo y encima de éste un trozo de papel filtro teniendo en cuenta la circunferencia del recipiente; dicho papel filtro fue humedecido cada dos días para permitir la ovipostura de huevos (**Figura 11, B**). Cabe destacar que todas las individualizaciones se realizaron y se mantuvieron en cabinas, previamente rotuladas con la fecha de infección y el número de mosquitos de cada cepa individualizadas. Dichas cabinas estuvieron ubicadas en la zona de infección del laboratorio Control de Vectores de CIDEIM (**Figura 11, C**).

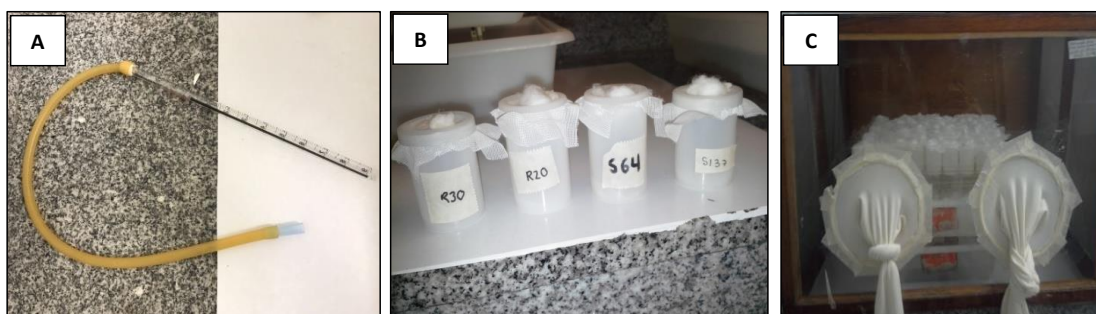


Figura 11. Individualización de mosquitos hembras de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Para realizar la individualización se mosquitos se utilizó un aspirador (A) y cada mosquito hembra fue colocado en un pequeño tarro acondicionado para la ovipostura de huevos (B). Todos los pequeños tarros en conjunto se mantuvieron durante 10 ± 15 días de post-infección en una cabina ubicada en la zona de infección del laboratorio de vectores en CIDEIM (C).

El mantenimiento de los mosquitos individualizados se realizó durante 10 ± 15 días de post-infección o periodo extrínseco de incubación, teniendo en cuenta factores estándares de laboratorio (temperatura, humedad y fotoperiodo). Transcurrido 2 a 3 días de post-infección se observó mancha de sangre en el papel filtro de cada recipiente y la ovoposición de huevos, los cuales fueron retirados en el papel filtro para pasar por un proceso de secado de 24 horas y

su posterior almacenamiento en condiciones de temperatura y humedad relativa, adecuadas para mantener su viabilidad.

✓ **Titulación del virus dengue-2**

La titulación del virus dengue-2 se llevó a cabo con el objetivo de conocer la concentración del virus utilizado para mezclar con la sangre, con la cual fueron alimentadas las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Para ello, se evaluaron las muestras almacenadas durante la alimentación artificial (mencionadas anteriormente). En general fueron procesadas por cada alimentación realizada: 1 muestra de sobrenadante del virus, 1 muestra de sangre sin virus y 2 muestras de sangre mezclada con virus al inicio y al final de la infección.

Para realizar la titulación se emplearon placas de 96 pozos de fondo plano con tapa. En la primera fila horizontal se sembraron 100µL de cada una de las muestras por triplicado, dejando un espacio entre éstas como controles negativos (**Figura 12**). En los demás pozos, primero se sembraron 90µL del medio nutritivo L-15 suplementado con SFB al 10%. Posterior a esto, se realizaron diluciones seriadas de 10µL. Terminadas estas diluciones, a cada pozo se le adicionó 90µL de medio L-15 con SFB al 2% con células C6/36HT, las cuales fueron previamente desprendidas del flask con un policia de vidrio estéril. Finalmente, cada una de placas utilizadas para la titulación del DENV-2, fue rotulada con el nombre de las muestras sembradas y selladas con papel parafilm, y se incubaron por siete días a una temperatura de $\pm 31^{\circ}\text{C}$.

Finalizado los siete días de incubación, cada una de las muestras sembradas en las placas con fondo plano fueron evaluadas con prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando un anticuerpo monoclonal [1:200] específico para el virus dengue, azul de Evans [1:200] como reactivo de contraste, el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína [1:200] y PBS. Para realizar la prueba IFI primero fue necesario verificar la presencia de contaminación por hongos en las muestras sembradas y de esta manera determinar el número de pozos a evaluar.

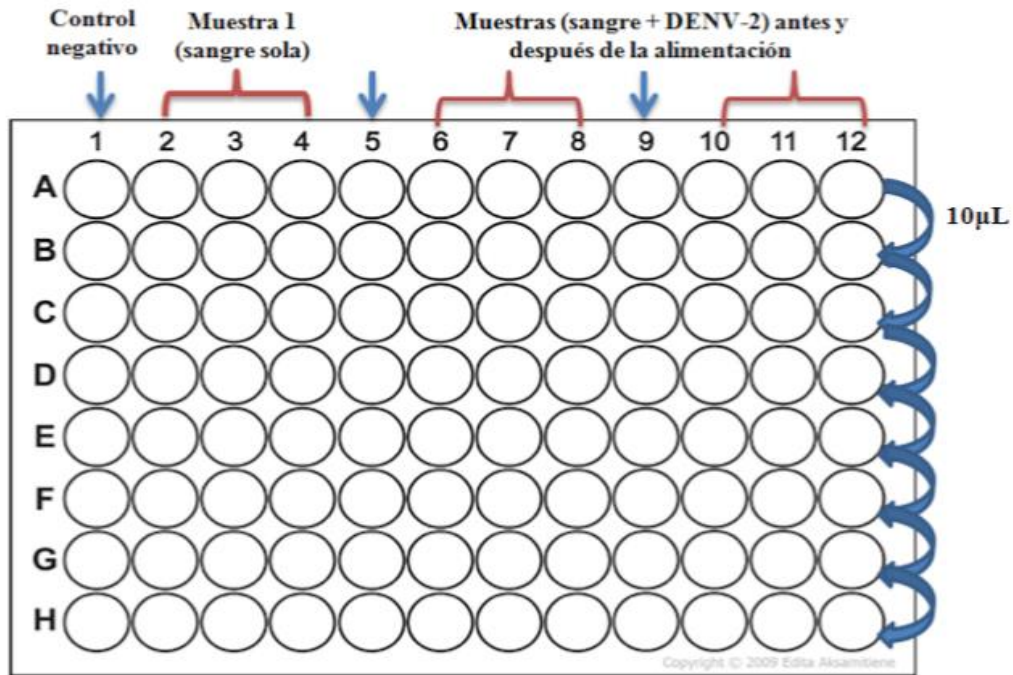


Figura 12. Titulación del DENV-2. Para determinar la concentración del DENV-2 a la cual fueron expuestos los mosquitos, se realizaron diluciones seriadas de 10 µL en placas de fondo plano. Se sembraron muestras por triplicado de sangre sola, sobrenadante del virus, sangre + virus antes y después de la alimentación.

A continuación, se eliminó el medio de cultivo de cada placa y se agregaron 50µL de acetona/PBS a cada pozo con el fin de fijar las células, posteriormente las placas se llevaron a 4°C durante una hora. Finalizado el tiempo, se desechó el contenido de acetona/PBS y se procedió a realizar la prueba IFI. En primer lugar, se adicionó el anticuerpo en cada pozo [1:150] y la placa se llevó a incubación durante 45 minutos a 37°C con agitación continua. Pasado este tiempo de incubación, el contenido del anticuerpo fue descartado y para eliminar su exceso, se realizaron dos lavados con PBS durante un minuto y otro con agua destilada por un minuto. Se añadió el fluorocromo [1:200] más el azul de Evans [1:200] a cada pozo y se incubó a 37°C por una hora en agitación continua. Se realizaron los lavados correspondientes con PBS y agua. Finalmente, se adicionaron 20µL de glicerina en todos los pozos de las placas empleadas, para ser visualizadas en el microscopio de inmunofluorescencia.

De acuerdo al número de pozos positivos para cada una de las muestras tituladas, la concentración del virus dengue-2, se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Tissue culture Infective Dose/mL (TCID50)} = \text{Log} \left(10^{-\text{(titulación positiva en los tres pozos)}} \right) - \text{Log}(10) * \left(1 + \left(\frac{\text{\#pozos positivos}}{\text{\#total de pozos}} \right) - 0.5 \right)$$

Ecuación 1. Fórmula para determinar la concentración del DENV-2.

✓ ***Disección de intestinos en las cepas Cali-S y Cali-MIB de Ae. aegypti***

Transcurrido el periodo extrínseco de incubación del virus dengue-2 en los mosquitos individualizados (10±15 días), se procedió a realizar la disección del intestino medio en cada uno de éstos. Para ello, primero fue necesario matar los mosquitos, colocando en bandejas todos los pequeños tarros para ser llevados al congelador durante 5 minutos. A continuación, cada uno de los mosquitos fueron puestos en tubos eppendorf de 1.5 mL debidamente rotulados con el número y cepa de *Ae. aegypti*, los cuales fueron almacenados a una temperatura de -80°C, con el fin de preservar el RNA.

Al momento de realizar las disecciones se tuvo en cuenta limpiar el estereoscopio, las pinzas entomológicas y el portaobjetos con agua libre de RNAsas. Seguidamente, el portaobjetos se colocó encima de una pila de hielo, con el fin de evitar la degradación del RNA. Para realizar la disección, con ayuda de las pinzas entomológicas primero se retiró la cabeza, luego las patas y alas del mosquito, quedando solamente el abdomen y tórax del vector. Luego, se adicionó una gota de PBS estéril en el portaobjetos para diseccionar el intestino medio, al cual se le retiraron los túbulos de Malpighi y los intestinos, posterior y anteroposterior (**Figura 13**). Una vez diseccionado el intestino medio, éste fue preservado en tubos de 200uL con 20uL de RNA later durante 2 semanas máximo a 4°C. En el caso en el que los intestinos se procesaban seguido al proceso de disección, estos fueron almacenados en 100µL de trizol® Reagente durante tres días máximo a una temperatura de -20°C, como lo sugirió el protocolo del reactivo.

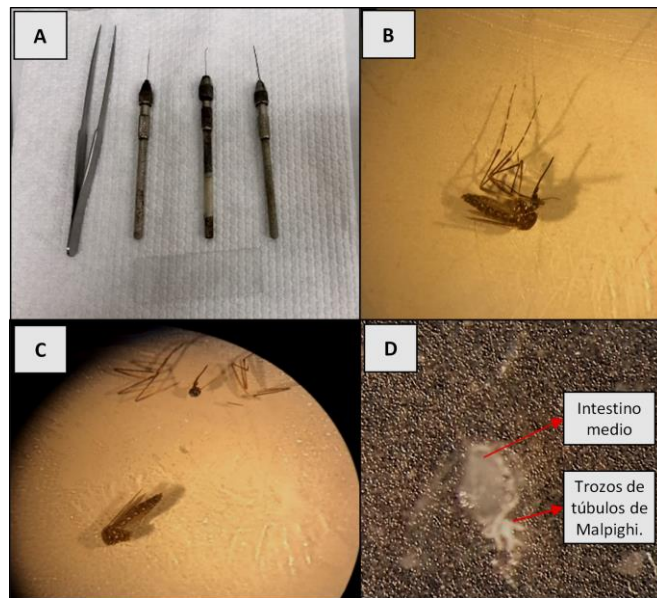


Figura 13. Disección de intestino medio de *Ae. aegypti*. Con pinzas entomológicas (A) se diseccionó el intestino medio (D), primero quitando primero alas, patas y cabeza (B), quedando solamente tórax y abdomen (C).

✓ **Extracción de RNA en intestinos medios diseccionados**

Con los intestinos diseccionados se efectuaron las extracciones de RNA utilizando un protocolo con trizol® Reagent. Cabe destacar que antes de llevar a cabo las extracciones de las muestras, se realizaron pruebas preliminares basadas en utilizar volúmenes diferentes de trizol y dos tiempos de incubación en isopropanol, con el objetivo de obtener una mayor cantidad y calidad de RNA. Inicialmente, se probaron volúmenes de 450µL de trizol y 10 minutos de incubación con isopropanol a temperatura ambiente. Posteriormente, se efectuó la otra variante del experimento con 550µL de trizol y una hora de incubación con isopropanol. Las muestras fueron procesadas con la segunda variante del protocolo.

En el caso en el que las muestras fueron almacenadas en RNA later®, el primer paso fue remover el RNA later del intestino, el cual había estado preservado a una temperatura de 4°C. Una vez el tejido quedó libre de RNA later®, se le adicionó 100µL de trizol® Reagent. Seguidamente, este volumen con el tejido fue transferido a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL con 150 µL de trizol. Se verificó que el intestino se haya disuelto y se adicionaron 250µL de este mismo reactivo y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente para ser llevado a centrifugar a 12000 g o rcf por 15 minutos a 4°C. Finalizada la centrifugación,

se obtuvieron dos fases: una fase acuosa (RNA) y fase orgánica (proteínas). La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, al cual se le adicionó 500 μ L de isopropanol, se mezcló suavemente y se incubó por una hora a temperatura ambiente para ser llevado a centrifugación a 12000 g o rcf por 15 minutos a 4°C. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1mL de etanol frío al 75%; nuevamente se centrifugó a la misma velocidad, tiempo y temperatura, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se removieron los restos de etanol colocando los tubos boca abajo en una servilleta limpia. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 15 μ L de agua libre de RNAsas estéril y se almacenó a una temperatura de -80°C.

✓ **Identificación de virus en intestinos**

El RNA extraído de los intestinos diseccionados de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* fueron utilizados para ejecutar una RT-PCR, con el fin de identificar el virus dengue-2 en dichos tejidos. Para esto, fue necesario cuantificar el RNA de cada muestra en el lector de platos Sinergy H₁ BioTek® y se procesaron aquellas que tuvieron al menos una cantidad de 5ng/ μ L de RNA total (punto de corte determinado en estudios previos por Caicedo PA et al., 2013).

Para llevar a cabo la RT-PCR, primero fue necesario obtener cDNA para cada una de las muestras de RNA, siguiendo el siguiente protocolo: inicialmente, en tubos eppendorf de 0.2mL se añadió 0.5 μ L del cebador D2 [50 μ mol/ μ L] (5'-AAGACATTGATGGCTTTTGA-3') (Shu et al., 2013) y 0.5 μ L de dNTPs [10 mM] y 5 μ L de RNA. Cada una las muestras fueron incubadas a una temperatura de 65°C durante 5 minutos en el termociclador BioRad®. A continuación, éstas fueron puestas en hielo y se les añadió 2 μ L de DTT [0.1M] y 1 μ L de buffer 5X. Nuevamente, los tubos eppendorf se colocaron en el termociclador a una temperatura de 42°C durante 2 minutos. Finalizado este tiempo, los ejemplares fueron puestas a temperatura ambiente para adicionarles 0.5 μ L de Super Script II®, para ser llevados otra vez al termociclador durante 50 minutos a 42°C. Terminado este tiempo de incubación, se inactivó la reacción a 70°C durante 15 minutos y finalmente la reacción fue llevada a infinito a 12°C.

Concluida la reacción para obtener cDNA, se ejecutó la primera ronda de PCR transcriptasa reversa (RT-PCR), teniendo en cuenta los siguientes volúmenes para cada tubo eppendorf de 0.2mL: 16 μ L de agua libre de RNAsas, 1.25 μ L de dNTPs [2.5mM], 1.5 μ L de MgCl₂ [25mM], 0.5 μ L de los cebadores D1 (5'-TCAATA TGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') (Lanciotti et al., 1992) y D2 (5'-AAGACATTGATGGCTTTTGA-3') (Shu et al., 2003), 2.5 μ L de buffer 10X, 0.1 μ L de Taq polimerasa® y 2.5 μ L de cDNA. Cabe destacar, que estos cebadores de Lanciotti et al. (1992) y Shu et al. (2003) amplifican la región del

gen de la proteína de membrana, es decir, es la secuencia diana para la detección del virus dengue a través de RT-PCR (Shu et al., 2003).

Todas las muestras fueron amplificadas con los siguientes ciclos: Un ciclo de un minuto a 95°C; 30 ciclos que comprendieron 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C, un minuto a 72°C y 7 minutos de extensión. Después, la reacción fue llevada a infinito a una temperatura de 4°C.

Terminada la RT-PCR, la identificación del virus se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%, en el cual se sembró 2µL ± 5 µL de muestra con 0.5 µL ± 1.5 µL de GelRed®, como método de marcaje de las muestras y se empleó buffer TBE 1X para la corrida a 72V. Para el análisis de estos productos de PCR, se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb a 1500pb. Adicional a esto, se tuvo como control positivo RNA extraído del sobrenadante del DENV-2 pase 4 de la cepa Nueva Guinea "C", a través de un kit específico viral QIAamp® Viral RNA.

✓ ***Determinación del fenotipo (susceptible/refractario) de las cepas Cali-S y Cali-MIB de Ae. aegypti***

El fenotipo de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* empleadas en este estudio se determinó a través de la evaluación de la presencia o no del virus en los intestinos de los mosquitos, usando RT-PCR. Los datos obtenidos fueron utilizados para calcular el porcentaje (%) de mosquitos con el fenotipo susceptible (presencia de virus) y refractario (ausencia de virus).

2.4.4 Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2

Para evaluar la transmisión vertical del virus dengue-2, se tuvo en cuenta la estandarización de extracción de RNA en huevos, por lo que se tomó un pool de 10 huevos viables de la progenie de cada mosquito hembra de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* (**Figura 14**), evaluadas previamente por RT-PCR para conocer su fenotipo (susceptible/refractario).

A cada pool 10 de huevos, se les realizó extracción de RNA con trizol® Reagent, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el ítem 2.4.2. Finalizadas las extracciones de RNA, se procedió a obtener cDNA y con ello RT-PCR para cada una de las muestras con el fin de evaluar la presencia/ausencia del DENV-2 en estadios inmaduros. Para ello, se llevó a cabo el mismo protocolo de RT-PCR descrito para evaluar el fenotipo de los mosquitos utilizados en este estudio. Con los datos cualitativos obtenidos, se determinó el porcentaje (%) de pool de huevos con virus dengue-2.



Figura 14. Pools de huevos de la cepa Cali-MIB de *Aedes aegypti*. En este estudio se evaluó la transmisión vertical del DENV-2 tomaron pools de diez huevos viables (forma ovalada) de la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*.

2.4.5 Secuenciación

Antes de procesar los extraídos de RNA del intestino medio y en los huevos de la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* para identificar el virus dengue-2, primero se realizaron ensayos preliminares del protocolo de RT-PCR utilizando controles positivos, los cuales fueron extraídos de RNA con kit específico para virus QIAamp® viral RNA en sobrenadante con pase 4, con el cual fueron expuestos los mosquitos durante la alimentación artificial; y mosquitos de la cepa Rockefeller de *Aedes aegypti* microinyectados con DENV-2. Adicional a esto, se realizó una RT-PCR con un gradiente de temperatura con el fin de evaluar la Tm de los primers de Lanciotti et al. (1992) y Shu et al. (2003) (**Figura 15**). El resultado de la RT-PCR visualizado en gel de agarosa al 1%, fue mandando a secuenciar y evaluado en BLAST (NCBI), con el fin de verificar la presencia del DENV-2 en el producto de PCR.



Figura 15. Productos de RT-PCR obtenidos con gradiente de temperatura. En este estudio se realizaron ensayos preliminares de RT-PCR con RNA extraído de sobrenadante pase 4 a 58°C (2), a 55°C (3), control negativo (4); pase 8 a 52.7°C (5) y 49.6°C (6), con un marcador de peso molecular de 100 a 1500 pares de bases (carriles 1 y 7). Las bandas obtenidas en el carril 2 y 3 (indicadas con flecha azul) se mandaron a secuenciar.

✓ **Microinyecciones**

Las microyecciones, utilizadas para obtener controles positivos, se realizaron utilizando un microinyector electrónico, con el cual se inyectó 4.6nL de virus dengue-2 en el cuello de mosquitos de la cepa Rockefeller. No obstante, antes de realizar este procedimiento, primero se durmieron los mosquitos, colocándolos durante 1 minuto en el congelador y durante las microinyecciones se empleó una pila de hielo, para evitar que se despertaran. Terminadas las microinyecciones, los mosquitos fueron puestos en jaulas de plástico durante 15 días, lo cual corresponde al periodo extrínseco de incubación. Finalizado este tiempo de post-infección se realizó extracción de RNA del mosquito con trizol® siguiendo un respectivo protocolo similar al protocolo descrito para la extracción de RNA en intestinos medio, con la diferencia de que en este caso particular se agregaron 750µL de trizol y el pellet fue resuspendido con 30µL de agua libre de RNAsas.

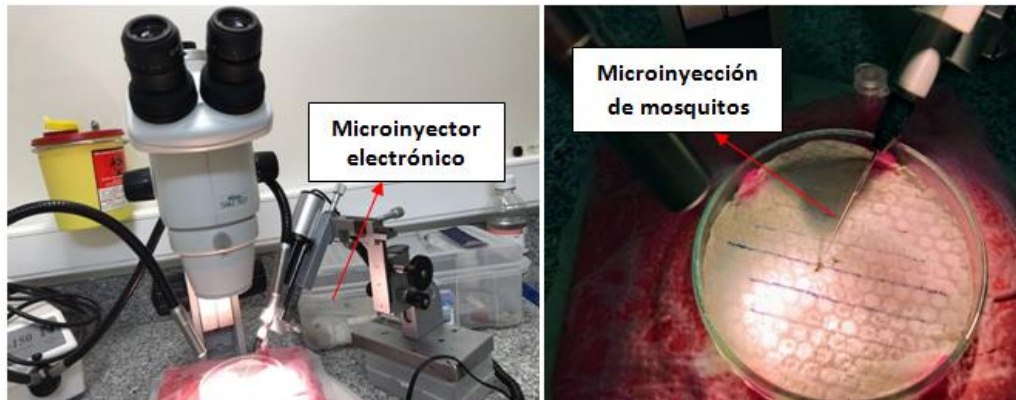
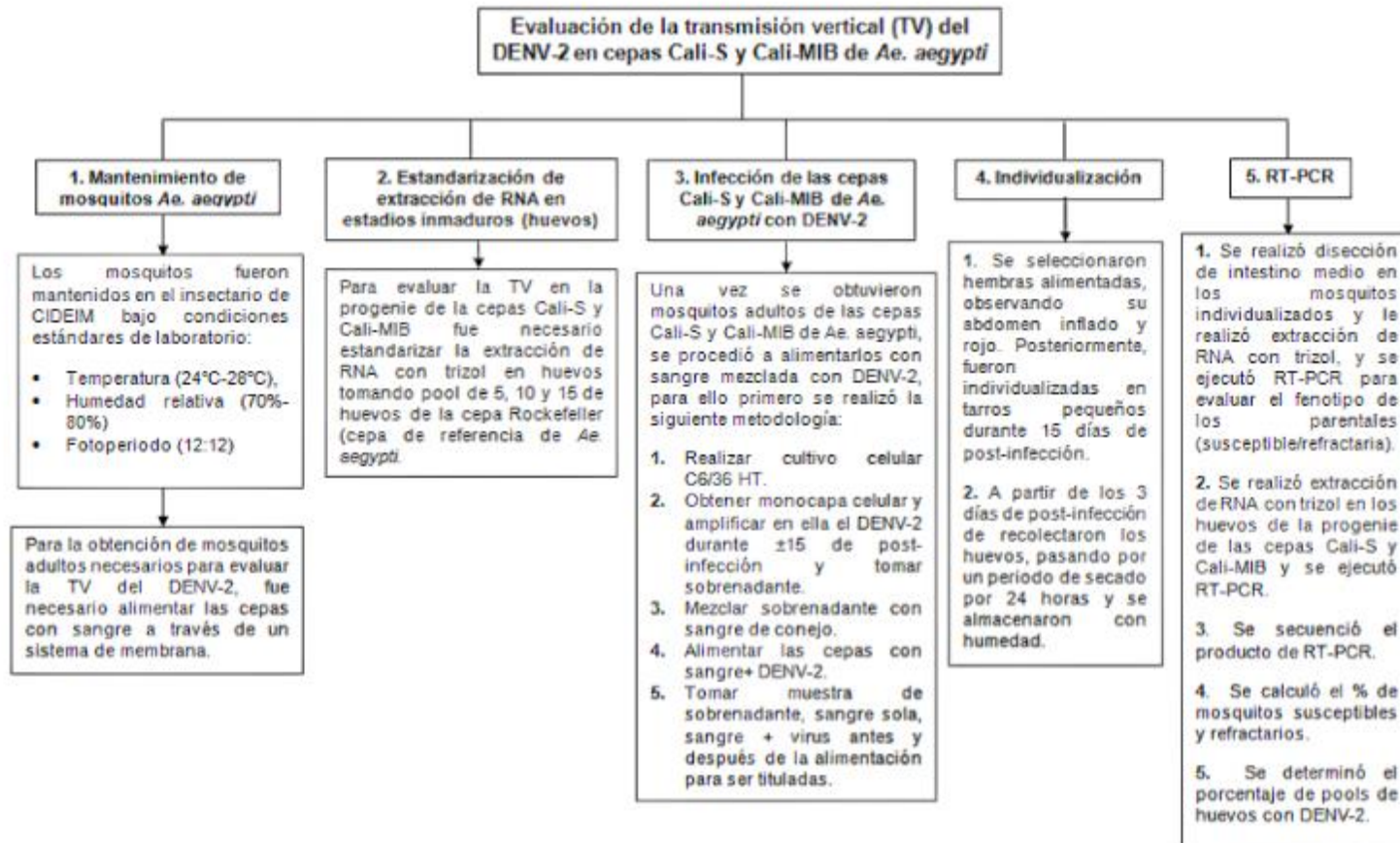


Figura 16. Montaje de microinyección. En este estudio se microyectarón mosquitos de la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti* con DENV-2, como controles positivos para la RT-PCR.

2.4.6 Diseño experimental



2.5 RESULTADOS

2.5.1 Estandarización de extracción de RNA en huevos de *Ae. aegypti*

La cuantificación de la extracción de RNA en pools de huevos de la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti* se presentan en la **Tabla 1**, se muestran las relaciones 260/280 y 260/230 como indicadores de la calidad del RNA extraído.

Con el proceso de extracción con Trizol® Reagente, se logró obtener RNA en los tres pooles evaluados. Se observó una relación directa entre el número de huevos y la cantidad de RNA extraído.

Tabla 1. Estandarización de extracción de RNA en estadios inmaduros (huevos) de la cepa Rockefeller de *Ae. aegypti*. Para cada pool de huevos, se registra por duplicado la concentración de RNA, la relaciones 260/280 y 260/230.

Cuantificación de RNA	Pools de huevos (n)					
	5		10		15	
Concentración de RNA total (ng/μL)	2,39	6,239	14,22	13,424	20,83	14,343
260/280	-0,64	2,484	4,12	1,518	2,48	1,712
260/230	0,01	0,009	0,04	0,048	0,09	0,022

2.5.2 Titulación del virus dengue-2

El resultado de la titulación del virus dengue-2 al que fueron expuestos las cepas Cali-S y Cali-MIB, dio a conocer las concentraciones del sobrenadante del virus, la ausencia de virus en la sangre antes de ser utilizada en las tres alimentaciones y la concentración del virus presente en la sangre al inicio y al final de las alimentaciones. En la **Tabla 2** se presentan las concentraciones obtenidas para cada una de las muestras mencionadas anteriormente en términos de media dosis infecciosa tisular (TCID₅₀/mL).

Tabla 2. Titulación del virus dengue-2 al cual fueron expuestos los mosquitos de las cepas Cali-S y Cali-MiB de *Ae. aegypti*. Se registran los valores de las concentraciones del DENV-2 antes y después de las alimentaciones realizadas en este estudio, el sobrenadante del virus y sangre sin DENV-2.

Muestras tituladas	Concentraciones (TCID50/mL)		
	Alimentación 1	Alimentación 2	Alimentación 3
Sangre sin virus	$10^{-0.5}$	$10^{-0.5}$	$10^{-0.5}$
Sobrenadante DENV-2	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$
Sangre + DENV-2 antes de la alimentación	$10^{-8.5}$	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$
Sangre + DENV-2 post-alimentación	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$	$10^{-9.5}$

Los resultados obtenidos de las muestras tituladas y evaluadas a través de la prueba de inmunofluorescencia (IFI) dieron a conocer el reconocimiento del anticuerpo monoclonal al antígeno (proteínas del virus dengue-2) en las células C6/36 HT de *Aedes albopictus*, como resultado de la infección con DENV-2 (**Figura 16**).

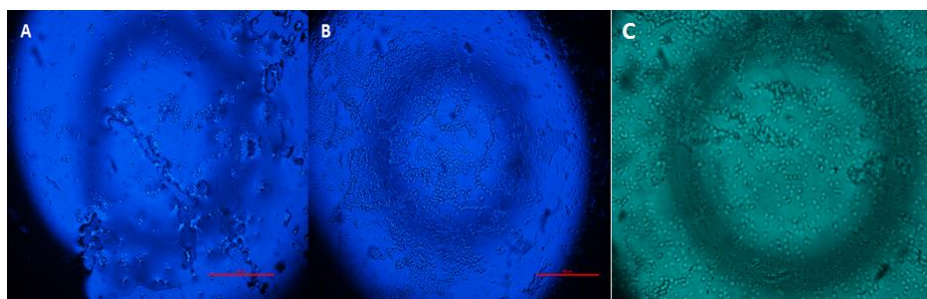


Figura 17. Inmunofluorescencia en muestras empleadas para la alimentación de mosquitos. A través de la prueba IFI se observó la presencia de DENV-2 en las muestras tituladas de sangre mezclada con el virus (A), sobrenadante (B) y como control negativo se tuvo sangre sola (C).

Además, tanto para las muestras de sobrenadante de los virus empleados como en las mezclas de sangre con virus, se detectó una concentración entre $10^{-8.5}$ y $10^{-9.5}$, las cuales son las concentraciones más altas en el proceso de titulación viral por la técnica de dilución en placas. Además se observó una concentración constante del virus durante las 2 horas de alimentación artificial.

2.5.3 Identificación de DENV-2 en intestinos de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*

En este estudio se evaluaron por RT-PCR 30 mosquitos de la cepa Cali-S y otros 30 de la cepa Cali-MIB de *Ae. aegypti*. En las **Figuras 18-21** se presentan los resultados cualitativos obtenidos en geles de agarosa al 1% para cada una de las cepas evaluadas de *Ae. aegypti*, utilizando un marcador de peso molecular (MPM) de 100 a 1500 pares de bases (pb) y como controles positivos mosquitos microinyectados con DENV-2 y sobrenadante DENV-2 pase 4.

En el caso de la cepa Cali-S, las muestras evaluadas presentaron en su mayoría una banda de 100pb, indicando un fenotipo susceptible ante la infección con virus dengue-2. Por el contrario, en la cepa Cali-MIB, se observó un fenotipo refractario (o ausencia de una banda en el gel) a la infección por DENV-2 en un 50%. La tasa de infección para cada de las cepas evaluadas se presenta en la **Tabla 3**.

✓ **Determinación de fenotipo susceptible/refractario en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti***

Con los datos cualitativos obtenidos de la RT-PCR, se determinó la tasa de infección en términos de porcentaje, para esto se tuvo en cuenta el número de mosquitos con los fenotipos susceptibles y refractarios para el DENV-2 observado en las cepas evaluadas de Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, y el total de muestras evaluadas de cada cepa.

Tabla 3. Determinación de tasa de infección del DENV-2 en las cepas Cali-MIB y Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Se registran los resultados obtenidos por RT-PCR para cada una de las cepas infectadas con DENV-2.

Cepa de <i>Ae. aegypti</i>	Muestras evaluadas (n)	Fenotipos (n)		Tasa de infección DENV-2 (%)	
		Susceptible	Refractario	Susceptible	Refractario
Cali-S	30	27	3	90	10
Cali-MIB	30	15	15	50	50

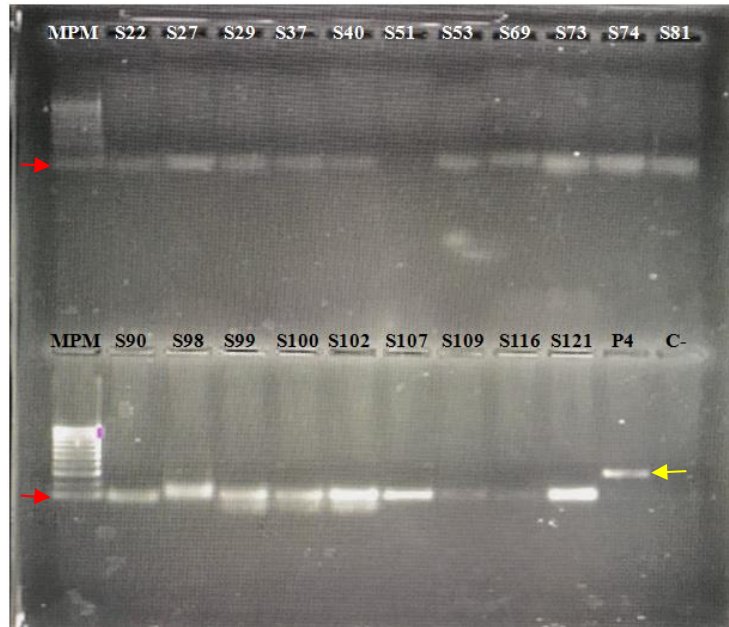


Figura 18. Resultados cualitativos de los productos de RT-PCR para los extraídos de RNA de la cepa Cali-S de *Ae. aegypti*. En las muestras evaluadas de la cepa susceptible (S22-S121), se observa una banda de aproximadamente 100pb (presumiblemente DENV-2, indicado con fecha roja), excepto para el control positivo (sobrenadante DENV-2, pase 4), con un tamaño de 300pb (flecha amarilla).

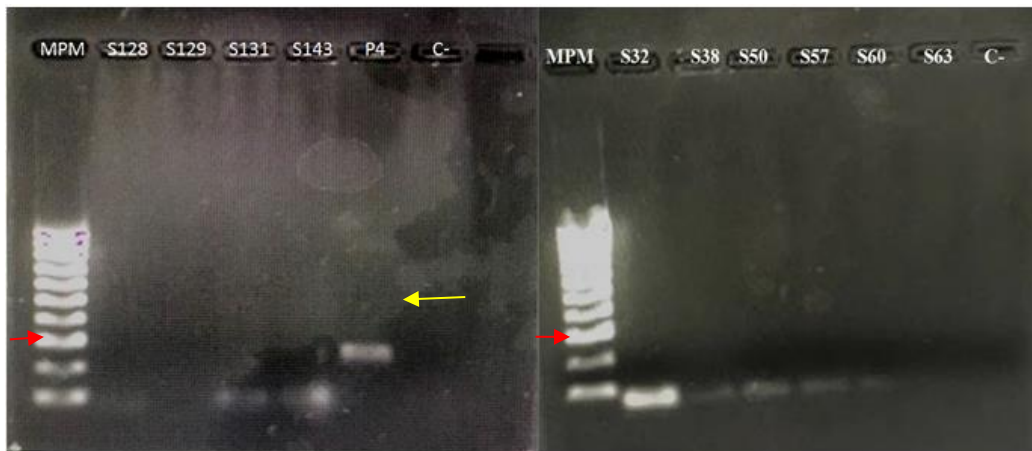


Figura 19. Fenotipos obtenidos por RT-PCR de la cepa Cali-S de *Ae. aegypti*. Las muestras evaluadas de la cepa Cali-S de *Ae. aegypti* presenta un fenotipo susceptible en su mayoría, presentando un banda de 100 pb (flecha roja). Se tuvo como control positivo RNA extraído del sobrenadante DENV-2, mostrando una banda de 300pb (flecha amarilla).

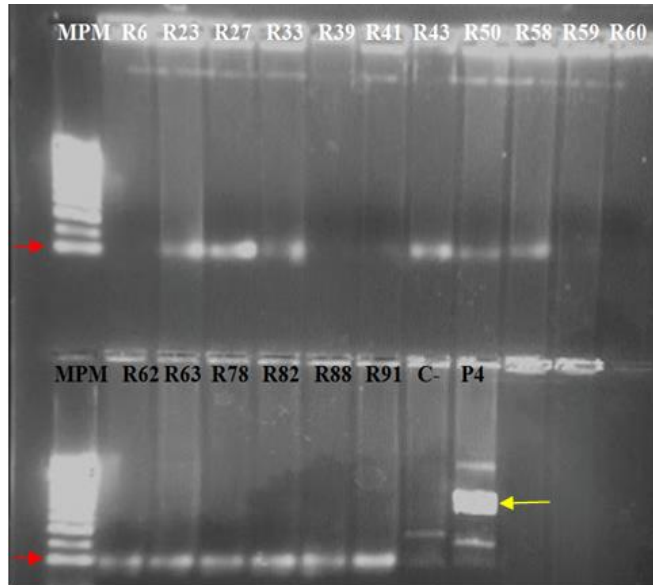


Figura 20. Productos de RT-PCR para los extraídos de RNA en intestinos de la cepa Cali-MIB de *Ae. aegypti*. El resultado de la electroforesis muestra en varias muestras la presencia de DENV-2 con una banda de 100pb (indicada con fecha roja), excepto el control positivo (sobrenadante DENV-2, pase 4, flecha amarilla) y el resto de las muestras evaluadas presentan el fenotipo refractario a la infección por el virus.



Figura 21. Fenotipo de las muestras evaluadas de Cali-MIB por RT-PCR. Ante la infección con DENV-2, parte de las muestras procesadas de la Cali-MIB (R9-R87) presentaron un fenotipo refractario a la infección por el virus.

2.5.4 Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2

Los resultados cualitativos obtenidos a través de RT-PCR para la evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2 se presentan en las Figuras 22 y 23, mostrando una banda de 100pb en su mayoría (fenotipo susceptible). A continuación en la **Tabla 4** se presentan los resultados obtenidos del fenotipo de cada pool de huevos de la progenie de las cepas evaluadas (susceptible/refractario) y la tasa de infección para cada caso.

Tabla 4. Evaluación de la transmisión vertical del virus dengue-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Se registran los fenotipos de los huevos de progenie de las cepas de *Ae. aegypti* (susceptible/refractario).

Cepas de <i>Ae. aegypti</i>	Parentales evaluados (n)	Progenie evaluada (n)	Fenotipo de la progenie (n)		Tasa de infección de parentales (%)		Tasa de infección de progenie (%)	
			S	R	S	R	S	R
Cali-S	30	21	16	5	90	10	76	24
Cali-MIB	30	22	20	2	50	50	91	9

S: susceptible; R: refractario.

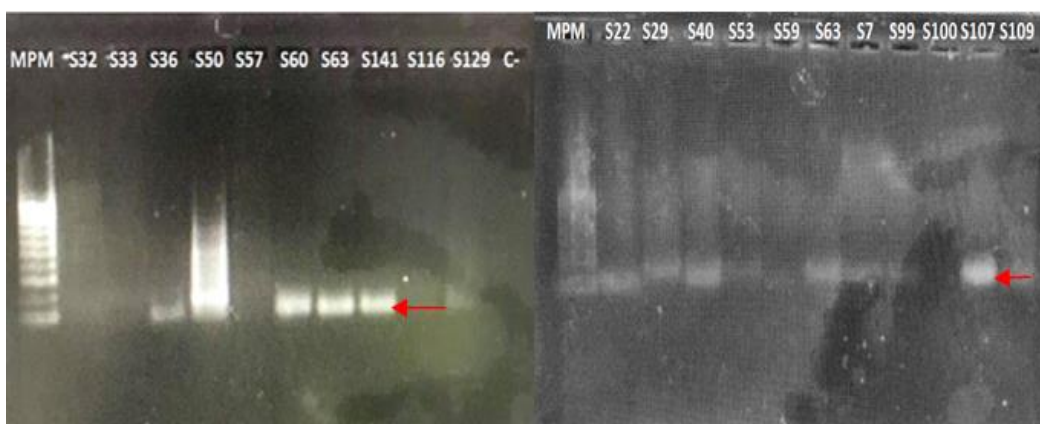


Figura 22. Resultado de RT-PCR en huevos de la progenie de la cepa Cali-S de *Ae. aegypti*. Los huevos en pool de la progenie de la cepa Cali-S (S32-S109) presentan en su mayoría un fenotipo susceptible a la infección por el DENV-2, con una banda de 100pb (indicada con la flecha roja).

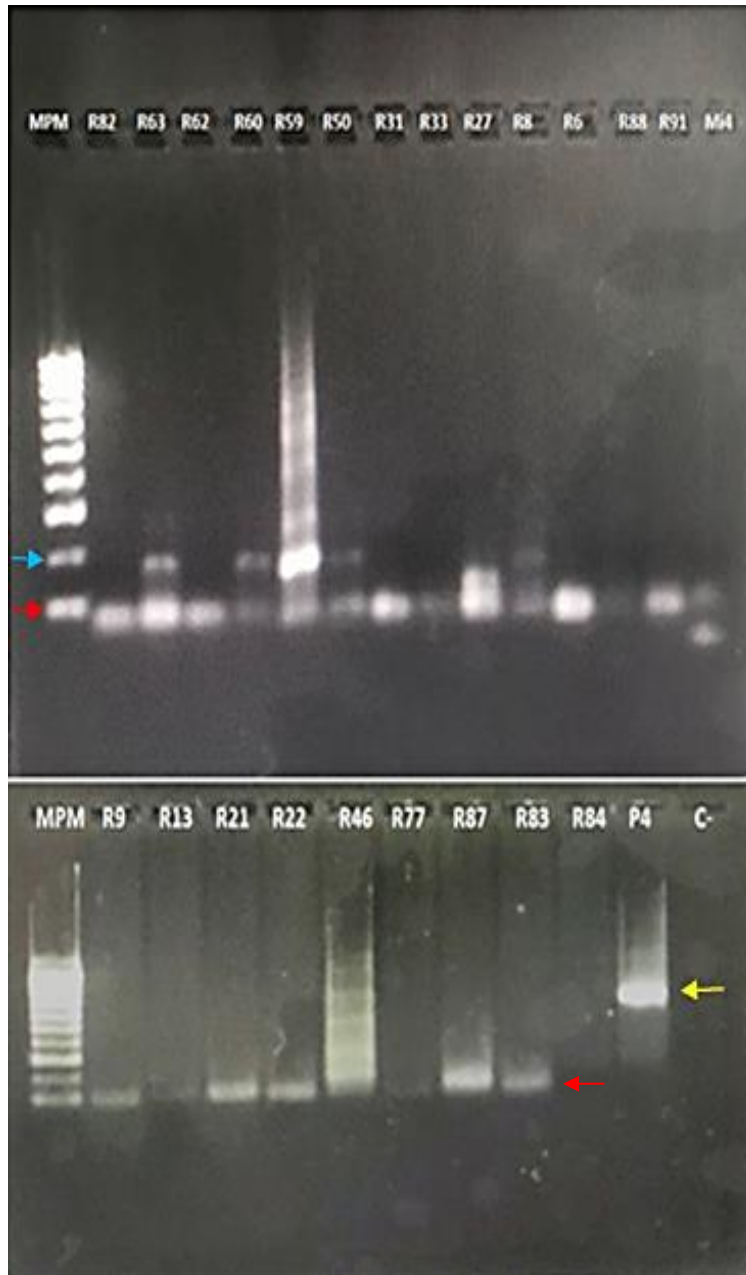


Figura 23. Evaluación de la transmisión vertical en huevos de la progenie de la cepa Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Los productos de RT-PCR obtenidos de los pools de huevos de la cepa Cali-MIB dan a conocer una banda de 100pb (flecha roja) y otras una banda de 200pb (flecha azul). Se tuvo como controles positivos un mosquito Rockefeller microinyectado (gel superior) y sobrenadante DENV-2 pase 4 (gel inferior), con una banda por encima de 300 pb (aproximadamente 700 pb) (flecha amarilla).

2.5.5 Secuenciación

Las secuencias Fasta obtenidas del producto de RT-PCR del sobrenadante virus Dengue-2, pase 4 al ser analizadas en Nucleotide Blast, dieron como resultado virus dengue-2 (**Figura 24**). Las secuencias analizadas fueron las siguientes:

P4-1 D2

```
TMATCTCTTMGTATCCCTGCTGTTGGTGGGATTGTTAGGAAACGAAGGAACG
CCACCAGGGCCATGAACAGTTTTAATGGTCCTCGTCCCTGCAGCATTCCAAGT
GAGAATCTCTTTGTCAGCTGTTGTACAGTCGACACGCGGTTTCTCGCGCGTTT
CAGCATATTGAA
```

P4 D2

```
TATCTCTTMGTATCCCTGCTGTTGGTGGGATTGTTAGGAAACGAAGGAACGC
CACCAGGGCCATGAACAGTTTTAATGGTCCTCGTCCCTGCAGCATTCCAAGT
GAGAATCTCTTTGTCAGCTGTTGTACAGTCGACACGCGGTTTCTCGCGCGTTT
CAGCATATTGAA
```

Secuencias que producen alineaciones significativas:

Seleccionar: [Todos](#) [Ninguno](#)

Seleccionado: 0

Alineaciones [Descargar](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Árbol de resultados de distancia](#)

Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Ident	Adhesión
<input type="checkbox"/> Vector quimérico del virus del dengue p4 (Delta30) -D2-CME, secuencia completa	296	296	99%	3e-78	98%	AY243469.1
<input type="checkbox"/> Vector quimérico del virus del dengue p4-D2-CME, secuencia completa	296	296	99%	3e-78	98%	AY243468.1
<input type="checkbox"/> Virus de la dengue 2 aislado gen DENV2, China, SZ, 2015 poliproteína, cds completos	296	296	99%	3e-78	98%	KJ094070.1
<input type="checkbox"/> El virus del dengue 2 aisló GW6, completa el genoma	296	296	99%	3e-78	98%	KM587709.1
<input type="checkbox"/> Dengue virus 2 cepa Nueva Guinea C, genoma completo	296	296	99%	3e-78	98%	KM204118.1

Figura 24. Resultado de secuencias similares a las secuenciadas del producto de RT-PCR del sobrenadante del virus dengue-2, pase 4. Las secuencias arrojadas por Blast Nucleotide muestran secuencias de dengue-2 de diferentes cepas, entre las que se encuentra la cepa New Guinea “C”, la cual es la cepa del sobrenadante DENV-2 utilizada en este estudio.

2.6 DISCUSIÓN

El dengue es una de las enfermedades infecciosas que contribuyen significativamente a la tasa de morbilidad en el mundo, números estudios hablan acerca de sus mecanismos de transmisión (horizontal y vertical) (Lequime, Pau & Lambrechts, 2016). En este estudio, se evaluó la transmisión vertical del virus dengue-2 en los huevos de la progenie de cepas Cali-S y Cali-MIB de *Aedes aegypti*, para ello fue esencial realizar la estandarización de RNA en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* (huevos), los resultados obtenidos para cada pool de huevos de la cepa Rockefeller evaluados (5, 10 y 15) dieron a conocer que con un mínimo de 10 huevos es suficiente para llevar a cabo una RT-PCR. Esto se fundamenta con las relaciones 260/280 y 260/230, las cuales son utilizadas para verificar la pureza del RNA (Osorio, Pachajoa & Hurtado, 2013). Por un lado, la relación 260/280, se utiliza para evaluar la cantidad de contaminación de proteínas en las extracciones, las cuales quedan durante el proceso de aislamiento de ácidos nucleicos, ya que las proteínas presentan una absorbancia de 280nm, cuando este valor es cercano a 2, se garantiza la pureza de la extracción de RNA (Osorio, Pachajoa & Hurtado, 2013). En cuanto a la relación 260/230, esta indica la cantidad de disolventes orgánicos (fenol, cloroformo) presentes en los extraídos (Osorio, Pachajoa & Hurtado, 2013). En este estudio, para el caso del pool de 10 huevos, se obtuvieron valores de 1.5 para la relación 260/280 y 0.04 para la relación 260/230. Esta última al ser tan baja, puede ser producto de residuos de fenol, cloroformo e isopropanol, reactivos utilizados para realizar las extracciones.

Por otra parte, en este estudio se determinó la concentración del virus dengue-2 como la media dosis infecciosa en tejido tisular por mililitro (TCID₅₀/mL), los resultados arrojados mostraron una alta viremia (en la escala de la técnica de titulación) en la sangre mezclada con DENV-2 utilizada para alimentar las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*. Además, las concentraciones del DENV-2 fueron similares en la sangre antes y después de la alimentación. Adicional a esto, se comprobó la esterilidad de la sangre utilizada.

Nguyen et al. (2013) identificaron las características de viremia que conducen a la infección por DENV en *Aedes aegypti* a través de la toma de sangre en un huésped infectado. La viremia en los seres humanos requeridos para infectar el 50% de los mosquitos difería entre los serotipos, en donde la dosis infecciosa del mosquito al 50% con DENV-2 es 6,29-6,51 log₁₀ copias de ARN /mL, en este estudio se expuso al mosquito a una dosis más alta (9.5 Log₁₀ copias de RNA/mL), por lo que se esperaba identificar el DENV-2 en la mayoría de los mosquitos evaluados, principalmente en los mosquitos de la cepa Cali-S, con un fenotipo susceptible a la infección por el virus dengue en un 98% (Caicedo et al., 2013). En cuanto a la cepa Cali-MIB, con un fenotipo refractario a la infección por el virus en su intestino medio en un 48% (Caicedo et al., 2013), se esperaba que en la mayoría de las muestras evaluadas de esta cepa no se evidenciara la presencia del DENV-2. Aunque en este estudio no se evaluó un tamaño muestral representativo, los resultados obtenidos en la determinación de los fenotipos de las cepas Cali-S y Cali-MIB

concuerdan con lo descrito por Caicedo et al. (2013), debido a que en un 90% y 50% se presentó el fenotipo susceptible y refractario en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, respectivamente.

Bennett et al. (2002) identificaron una asociación positiva entre el título viral de DENV-2 en la sangre infecciosa y la proporción de *Aedes aegypti* con un intestino medio infectado, lo cual podría ser un argumento para explicar porqué la mayoría de las muestras evaluadas presentan un fenotipo susceptible, teniendo en cuenta que la viremia suministrada a los mosquitos fue alta en relación a la dosis mínima para generar mosquitos infectados reportada por Nguyen et al. (2013). Cabe destacar que dichos fenotipos presentados en las cepas de *Ae. aegypti* están influenciados por la competencia vectorial, definida como la capacidad del vector para adquirir, replicar y transmitir el patógeno (Caicedo et al., 2013; Carrington & Simmons, 2014). Asimismo, la competencia vectorial está genéticamente determinada, y los rasgos genéticos que influyen tanto en la infección del intestino medio como en las barreras de escape se han asignado a varios loci de los cromosomas de *Ae. aegypti* (Tuiskunen & & Lundkvist, 2013).

Como se dijo anteriormente, uno de los objetivos del estudio fue identificar el virus dengue-2 en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, para esto se ejecutó una RT-PCR con el protocolo de Lanciotti et al. (1992) y Shu et al. (2013), los resultados arrojados no concuerdan con lo indicado en la literatura, es decir, con el protocolo de Lanciotti et al. (1992) se esperaba una banda de 511 pb y en el caso de Shu et al., (2013) una banda de 200 pb; sin embargo en el estudio se encontró un patrón de bandas de 100pb en la mayoría de las muestras evaluadas, posiblemente dengue-2. Adicional a esto, se tuvo como control positivo RNA extraído del sobrenadante DENV-2 pase 4 utilizado en este estudio, arrojando una banda de 300pb, la cual fue secuenciada y verificando la presencia de DENV-2 de la cepa New Guinea "C". Esta discrepancia entre lo esperado y lo obtenido en la identificación del fenotipo de las cepas Cali-S y Cali-MIB puede ser sustentado con la tasa de mutación que presentan los virus. Esto debido a que los virus sufren cambios en su genoma a través de la mutación. Dicha mutación ocurre cuando se incorpora un error en el genoma viral (Fleischmann, 1996). No obstante, las mutaciones surgen por tres mecanismos: **(1)** por efectos de mutágenos físicos, como lo son la luz ultravioleta, sobre los ácidos nucleicos; **(2)** por el comportamiento natural de las bases que componen los ácidos nucleicos y **(3)** a través de la falibilidad de las enzimas que replican los ácidos nucleicos (Fleischmann, 1996). En el caso de los virus estos mecanismos podrían inducir a una variación fenotípica (Fleischmann, 1996). Además, los virus al tener genoma RNA son replicados por RNA polimerasa, la cual carece de capacidad de corrección, por tanto las tasas de mutación en los virus son muy altas, conocidas como por pares de bases (pb) por generación. Los virus con RNA monocatenario tienen tasas de mutación entre 10^{-4} y 10^{-6} pb por generación (Lauring & Andino, 2013) y se debe tener en cuenta que los virus empleados en este trabajo han sido utilizados en laboratorio de control de vectores de CIDEIM durante varios años, lo que puede explicar la presencia de posibles mutaciones en estos virus. Además, estas tasas de mutación podrían provocar que los cebadores de Lanciotti et al. (1992) y Shu et al. (1992) no

amplifiquen en las posiciones 134 a 644 del genoma del virus, dando a conocer una banda de aproximadamente 511pb.

En cuanto a la transmisión vertical, también llamada transmisión transovarial, del virus dengue en mosquitos fue descubierta en la década de 1970, y se ha sugerido como un mecanismo por el cual el virus persiste en la naturaleza (Grunill & Boots, 2015). Si bien la transmisión horizontal (humano-mosquito-humano) del virus dengue determina en gran parte la epidemiología de la enfermedad, se sugiere la transmisión vertical (descendientes infectados con el virus) como un mecanismo que asegura el mantenimiento del virus durante condiciones adversas para la transmisión horizontal (Gutiérrez et al., 2017; Pessoa et al., 2012).

Aunque la ocurrencia de la transmisión vertical en la naturaleza del virus dengue aún se debate y no se evidencian reportes de su ocurrencia en cepas de mosquitos *Aedes aegypti*, se considera que es un mecanismo de transmisión al cual se le debe dar gran importancia para su evaluación en Colombia, teniendo en cuenta que es uno de los países de las Américas más afectado por la enfermedad del dengue. Adicional a esto, Romero y colaboradores (1998) determinaron serotipos del virus dengue en mosquitos adultos de *Ae. aegypti* recolectados en Puerto Triunfo, ubicado en el departamento de Antioquia y concluyeron que no ocurre transmisión vertical del virus dengue. Diferente a lo encontrado en este estudio, en donde el aislamiento y la detección del virus dengue-2 en huevos de la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* infectados artificialmente, registró la posible ocurrencia de transmisión vertical en un 76% en la cepa susceptible (Cali-S) y en un 91% en la cepa refractaria a la infección por el virus en el intestino medio (Cali-MIB), indicando que los mosquitos no sólo desempeñan un papel como vectores biológicos sino que probablemente también cumplen un papel como reservorios del virus dengue (Khan et al., 2017). Cabe destacar que múltiples estudios similares al realizado en esta investigación han demostrado la ocurrencia de la transmisión vertical del DENV tanto en laboratorio como en la naturaleza, tanto para *Ae. aegypti* como para *Ae. albopictus* (Buckner, Alto & Lounibos, 2013), como lo es el trabajo realizado por Lee & Rohani (2005) en Malasia, donde reportan la transmisión vertical del DENV en estos vectores recolectados en campo.

Como se dijo anteriormente, en este estudio se evaluó la transmisión vertical en los huevos de la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*, los cuales en su morfología, son largos, lisos, de forma ovalada y de aproximadamente un milímetro de largo (**ver Figura 14**) (Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016). En cuanto a su desarrollo, en climas cálidos, como los trópicos, los huevos pueden eclosionar en aproximadamente dos días, mientras que en climas templados y fríos, el desarrollo de este estadio inmaduro puede tardarse semanas (Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016). Adicional a esto, los huevos de *Ae. aegypti* pueden sobrevivir a la desecación durante meses y eclosionar una vez las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo, lo cual es un factor que dificulta el control vectorial de los mosquitos (Mukhtar, Tamerat & Shewafera, 2016; Ebi & Nealon, 2016). Con base en esto, los huevos infectados podrían sobrevivir durante meses y una vez las condiciones ambientales son favorables para su eclosión hasta completar el ciclo

de vida del mosquito, éste último podría a través de la alimentación hematófaga transmitir el virus a humanos, explicando de esta manera la incidencia de la enfermedad del dengue durante periodos interepidémicos, donde las condiciones no son favorables para la transmisión del virus, pero aún así se registran casos de pacientes con la enfermedad viral (Buckner, Alto & Lounibos, 2013).

Si bien, los productos de RT-PCR en la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB dan a conocer un patrón de bandas con un tamaño de 100 pares de bases, presumiblemente virus dengue-2, este estudio no puede asegurar la ocurrencia de la transmisión vertical debido a que no se evaluó un tamaño muestral representativo de cada una de las cepas de *Ae. aegypti*, ni se observó este comportamiento en generaciones sucesivas. Adicional a esto, no se evaluó por RT-PCR la detección del virus en otros estadios de la progenie (larva y adulto), con el fin de conocer si el virus se mantiene durante todo el ciclo de vida del mosquito. Por último, la banda de 100pb obtenidas en la mayoría de las muestras evaluadas en este estudio no ha sido secuenciada para verificar que efectivamente es virus dengue-2.

Lo anterior se sustenta con el hecho de que el éxito de la transmisión vertical de un patógeno como el virus dengue, es una función del número de descendientes infectados generados a partir de una hembra mosquito infectada con el virus, también puede estar influenciada por los rasgos del ciclo de vida del mosquito y las interacciones virus-vector (Buckner, Alto & Lounibos, 2013). En cuanto a los rasgos del ciclo de vida del vector que pueden afectar el éxito de la transmisión vertical, se encuentra la fecundidad de los mosquitos hembra, lo cual está estrechamente relacionado con el tamaño del vector en su estadio adulto (Buckner, Alto & Lounibos, 2013). Además de ser influenciada por el tamaño, la fecundidad también puede verse afectada por las interacciones con los patógenos, indicando que posiblemente este mecanismo de transmisión pueda disminuir la fecundidad del vector (Buckner, Alto & Lounibos, 2013). Sin embargo, en este estudio sólo se seleccionaron hembra con más de diez huevos como progenie, más no se tuvo en cuenta el número de ovipuestas ni el tamaño de cada una de las hembras evaluadas durante la investigación, aunque sí se observó que la cepa Cali-MIB presentó un número de ovipuestas menor en relación a la Cali-S, esto puede ser producto de la selección y colonización de las cepas en el insectario de CIDEIM (Caicedo et al., 2013; Ocampo & Weson, 2004). Además, aún se desconocen varios aspectos en cuanto a la interacción virus-vector y su relación con los rasgos del ciclo de vida del vector. No obstante, se sabe que además de la competencia vectorial, la reproducción en una población de mosquitos, puede afectar la dinámica de la transmisión de arbovirus, como lo es el dengue (Buckner, Alto & Lounibos, 2013).

Esta última premisa podría ser un argumento a la relación entre fenotipo o competencia vectorial de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* con la ocurrencia de la transmisión vertical, debido a que los reportes presentados por Caicedo et al (2013), dan a conocer que la cepa Cali-MIB, con fenotipo refractario a la infección por el virus dengue no es lo es un 100%, sino en 48%, es decir la transmisión vertical podría estar induciendo a que la cepa no sea totalmente refractaria a la infección por DENV, ya que como se dijo anteriormente, la eficacia

de la transmisión vertical depende en gran medida de la interacción entre el ciclo gonotrófico, el cual inicia con la ingesta de sangre y finaliza con la ovipuesta de huevos, y la dinámica de la infección viral (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016).

En caso de las cepas Cali-MIB y Cali-S de *Ae. aegypti*, es posible que la descendencia producida después del primer ciclo gonotrófico presente mayores tasas de transmisión vertical (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). Esto puede atribuirse a la falta de diseminación del virus a los ovarios de la hembra antes de se produzcan la primera ovipostura de huevos y un aumento a la permeabilidad del virus en los ovarios durante la ovogénesis después del primer ciclo gonotrófico (Lequime, Paul & Lambrechts, 2016). Por tanto, para asegurar la ocurrencia de la transmisión vertical del dengue-2 sería necesario evaluar sucesivas generaciones de las cepas de *Ae. aegypti*.

2.7 CONCLUSIONES

- En este estudio se logró identificar el virus dengue en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*; presentando Cali-S un fenotipo susceptible en un 90% a la infección por el virus dengue-2 y Cali-MIB un fenotipo refractario a la infección en un 50%.
- La estandarización para la extracción de RNA en huevos indicó que con un mínimo de 10 huevos en pool de *Ae. aegypti* es suficiente para ejecutar una RT-PCR.
- En este estudio se observó variabilidad entre el número de ovipuestas en las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*; obteniéndose un mayor número de huevos por parte de la cepa Cali-S, esto como producto de la selección y colonización de las cepas en el insectario de CIDEIM.
- En esta investigación se reporta una posible ocurrencia de transmisión vertical del virus dengue-2 en los huevos de la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti*.
- De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que posiblemente exista una relación entre el fenotipo de las cepas Cali-S y Cali-MIB de *Ae. aegypti* y la ocurrencia de la transmisión del virus dengue-2.
- La transmisión vertical puede ser un mecanismo por el cual se dé el mantenimiento del virus dengue durante condiciones adversas para la ocurrencia de la transmisión horizontal a través de la picadura de mosquitos *Ae. aegypti*.
- Los protocolos de RT-PCR de Lanciotti et al. (1992) y Shu et al. (2003) utilizados en este estudio no permitieron obtener resultados cualitativos similares a los reportados en la literatura para la detección de virus dengue-2, posiblemente por la tasa de mutación que presentan los virus y como consecuencia los primers no se unen correctamente a la secuencia del virus dengue.

2.8 RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudio, se recomienda evaluar la transmisión vertical en generaciones sucesivas de las cepas Cali-S y Cali-MIB, con el fin de comprobar si hay una relación directa entre el fenotipo de las cepas (susceptible/refractario) con la ocurrencia de la transmisión vertical.
- Aún se desconocen aspectos en cuanto a la relación que existe entre concentración del virus dengue-2 y su transmisión vertical (TV), por tanto, se recomienda evaluar la TV a diferentes concentración del DENV-2 en las cepas Cali-S y Cali-S, y observar si existe una relación directa o independiente en ambas variables.
- De acuerdo a la discrepancia obtenida en los resultados cualitativos para la presencia del DENV-2 en las cepas de *Ae. aegypti* evaluadas en este estudio, se recomienda clonar la banda de 100pb obtenida, para comprobar efectivamente que el producto de RT-PCR obtenido sea virus dengue-2.
- Se recomienda ejecutar otro protocolo de RT-PCR para la detección de virus dengue en extraídos de RNA, con el cual se pueda comprobar de una manera efectiva la presencia/ausencia del DENV-2 en las muestras a evaluar.
- Aunque en esta investigación se evaluó la transmisión vertical (TV) del virus dengue-2 en cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en campo, éstas han sufrido un proceso de selección y colonización, por tanto se recomienda evaluar la detección del DENV-2 en mosquitos recolectados en lugares donde se registren altas epidemia de DENV, especialmente en mosquitos machos y en estadios inmaduros (larvas).
- Finalmente, se aconseja evaluar la transmisión vertical del virus dengue-2 en diferentes estadios de la progenie de las cepas Cali-S y Cali-MIB (huevo, larva y adulto) a través de una PCR en tiempo real, con el fin de conocer cuánto varía la concentración del virus durante el ciclo de vida del vector.

3. BIBLIOGRAFÍA

Black, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M.,... & Beaty, B. J. (2002). Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of medical research*, 33(4), 379-388.

Bennett, K. E., Olson, K. E., de Lourdes Muñoz, M., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J. A., Higgs, S., ... & Beaty, B. J. (2002). Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(1), 85-92.

Buckner, E. A., Alto, B. W., & Lounibos, L. P. (2013). Vertical transmission of Key West dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. *Journal of medical entomology*, 50(6), 1291-1297.

Caicedo, P.A. (2008). *Selección por isofamilias de cepas susceptibles y refractarias de Aedes aegypti a infección con virus Dengue-2, a partir de una población obtenida en la ciudad de Cali* (tesis de pregrado). Universidad del Cauca, Cauca, Colombia.

Caicedo, P.A. (2014). Identificación de genes relacionados con la respuesta inmune innata de *Aedes aegypti* a la infección por virus dengue (tesis doctoral). Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Caicedo, P. A., Baron, O. L., Pérez, M., Alexander, N., Lowenberger, C., & Ocampo, C. B. (2013). Selection of *Aedes aegypti* (Diptera: Cululicidae) strains that are susceptible or refractory to Dengue-2 virus. *The Canadian Entomologist*, 145(03), 273-282.

Campbell-Lendrum, D., Manga, L., Bagayoko, M., & Sommerfeld, J. (2015). Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy?. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(1665), 20130552.

Carrington, L. B., & Simmons, C. P. (2014). Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. *Frontiers in Immunology*, 5,290. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00290>

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (Julio de 2015). *Hoja de datos sobre el Dengue*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/Dengue/hojados.htm>

Diamond, M. S., & Pierson, T. C. (2015). Molecular insight into dengue virus pathogenesis and its implications for disease control. *Cell*, 162(3), 488-492

Ebi, K. L., & Nealon, J. (2016). Dengue in a changing climate. *Environmental research*, 151, 115-123.

Fleischmann Jr, W. R. (1996). Viral genetics.

Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., & Nathan, M. B. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8, S7-S16.

Gutiérrez-Bugallo, G., Rodríguez-Roche, R., Díaz, G., Vázquez, A. A., Alvarez, M., Rodríguez, M.,... & Guzman, M. G. (2017). First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. *Acta tropica*, 174, 146-148.

Grunnill, M., & Boots, M. (2016). How important is vertical transmission of Dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *Journal of medical entomology*, 53(1), 1-19.

Hasan, S., Jamdar, S. F., Alalowi, M., & Al Ageel Al Beaiji, S. M. (2016). Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6(1), 1–6. <http://doi.org/10.4103/2231-0762.175416>

Heilman, J. M., De Wolff, J., Beards, G. M., & Basden, B. J. (2014). Dengue fever: a Wikipedia clinical review. *Open Medicine*, 8(4), e105.

Instituto Nacional de Salud (INS). (2016). *Boletín epidemiológico semanal (BES) (número 52 de 2016)*. [Archivo PDF]. Colombia: recuperado de <http://www.ins.gov.co/boletinepidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%20ADn%20epidemiol%20B3gico%20semana%2052%20-.pdf>

Khan, J., Khan, I., Ali, I., Iqbal, A., & Salman, M. (2017). The Role of Vertical Transmission of Dengue Virus among Field-Captured *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes in Peshawar, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(3).

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A., Shearer, F. M., Brady, O. J. ... & Coelho, G. E. (2015). The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data*, 2.

Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., & Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 30(3), 545-551.

Lauring, A. S., & Andino, R. (2010). Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS pathogens*, 6(7), e1001005.

Lee, H. L., & Rohani, A. (2005). Transovarial Transmission of Dengue Virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Relation to Dengue Outbreak in an Urban Area in Malaysia.

Lequime, S., Paul, R. E., & Lambrechts, L. (2016). Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS Pathog*, 12(5), e1005548.

Marinho, R. A., Beserra, E. B., Bezerra-Gusmão, M. A., Porto, V. D. S., Olinda, R. A., & dos Santos, C. A. (2016). Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraíba, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 41(1), 1-10.

Ministerio de Salud y Protección Social (2013). Dengue MEMORIAS. Bogotá, Colombia. [Archivo PDF]. Recuperado de https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_Dengue.pdf

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13-22.

Muktar, Y., Tamerat, N., & Shewafera, A. (2016). *Aedes aegypti* as a Vector of Flavivirus. *J Trop Dis*, 4(223), 2.

Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*, 5, 299.

Murrell, S., Wu, S. C., & Butler, M. (2011). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology advances*, 29(2), 239-247.

Nguyen, N. M., Kien, D. T. H., Tuan, T. V., Quyen, N. T. H., Tran, C. N., Thi, L. V.,... & Rabaa, M. A. (2013). Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9072-9077.

Ocampo, C. & Wesson, D. (2004). Population dynamics of *Aedes aegypti* form Dengue hyper-endemic urban setting in Colombia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 506-13.

Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). (Agosto de 2016). *Dengue*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/Dengue/hojados.htm>

Osorio, J., Pachajoa, H., & Hurtado, P. (2013). Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. *Revista Estomatología*, 21(1).

Padilla, J. C., Rojas, D. P., & Gómez, R. S. (2012). Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. *Guías de Impresión Ltda.*

Reis, N. N., da Silva, A. L., Reis, E. P. G., e Silva, F. C., & Reis, I. G. N. (2017). Viruses vector control proposal: genus *Aedes* emphasis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.*

Resiso, Salvador. (2012). *Estructura de los Flavivirus.* [Figura]. Recuperado de <http://epidemiologiamolecular.com/flavivirus/>

Romero-Vivas, C. M., Leake, C. J., & Falconar, A. K. (1998). Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Colombia. *Medical and veterinary entomology*, 12(3), 284-288.

Rothman, A. L. (2004). Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *Journal of Clinical Investigation*, 113(7), 946

Samuel, M., Maoz, D., Manrique, P., Ward, T., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., ... & Horstick, O. (2017). Community effectiveness of indoor spraying as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005837.

Salgado, D. M., Rodríguez, J. A., Lozano, L. D. P., & Zabaleta, T. E. (2013). Perinatal dengue. *Biomédica*, 33, 14-21.

Shu, P. Y., Chang, S. F., Kuo, Y. C., Yueh, Y. Y., Chien, L. J., Sue, C. L., ... & Huang, J. H. (2003). Development of group-and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *Journal of clinical microbiology*, 41(6), 2408-2416

Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., & Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 745-759.

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15(1), 33-43.

Villar, L. A., Rojas, D. P., Besada-Lombana, S., & Sarti, E. (2015). Epidemiological trends of dengue disease in Colombia (2000-2011): a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(3), e0003499.

Weeratunga, P., Rodrigo, C., Fernando, S. D., & Rajapakse, S. (2017). Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *The Cochrane Library.*